

# Identificación de péptidos de *Chlamydia trachomatis* procesados y presentados *in vivo* por HLA-B27

*Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias  
presentada por*

**Juan José Cragolini Gomar**

***Director***

**Dr. José Antonio López de Castro Álvarez**

Profesor de Investigación del C.S.I.C  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

***Tutor***

**Dra. María Luisa Toribio García**

Profesora de Investigación del C.S.I.C  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.



---

# Identificación de péptidos de *Chlamydia trachomatis* procesados y presentados *in vivo* por HLA-B27

Juan José Cagnolini Gomar

*Mayo de 2009*





## Summary

The obligate intracellular parasite *Chlamydia trachomatis* is a known pathogenic agent that triggers reactive arthritis (ReA), a spondyloarthropathy linked to the human Major Histocompatibility Complex molecule HLA-B27, through an unknown mechanism that might involve molecular mimicry between *chlamydial* and self-derived HLA-B27 ligands. Several bacterial sequences have been proposed as putative HLA-B27-restricted epitopes in the CTL responses of patients with ReA or have been shown to have high homology with constitutive self-ligands of HLA-B27. In this study we have set up an experimental system to address the issue of whether relevant sequences from individual bacterial proteins can be processed and presented by HLA-B27 *in vivo*. The method is based on the transfection of *GFP*-bacterial protein constructs into HLA-B27-positive cells, followed by proteomics-based comparison of the HLA-B27-bound peptide repertoires from cells transfected or not with the bacterial protein. Mass spectrometry-based comparative analysis of HLA-B27-bound peptide pools led to identification of five *Chlamydial* HLA-B27 ligands differentially presented in the transfectant cells expressing the bacterial proteins DNA primase, NQRA and PqqC, including: 1) a bacterial peptide with high homology with a self HLA-B27 ligand, 2) the first reported HLA-B27-restricted T-cell epitope that is endogenously presented by this molecule and recognized by CTL from patients with ReA, 3) three additional ligands that show high homology with multiple human protein sequences that possessed the optimal peptide motifs for HLA-B27 binding. In conclusion, expression of proteins from the arthritogenic bacteria *Chlamydia trachomatis* in HLA-B27 positive cells allows identifying bacterial peptides that are endogenously processed and presented by HLA-B27. The findings in this thesis validate this approach for the mapping of bacterial HLA-B27 ligands with putative relevance in the pathogenesis of ReA.



# Abreviaturas

A	Amperios
ATP	Trifosfato de Adenosina
$\beta_2m$	Beta-2-microglobulina
CE	Cuerpos Elementales
CNX	Calnexina
CR	Cuerpos Reticulares
CRP	<i>60 KDa-cysteine-rich outer membrane protein</i>
CRT	Calreticulina
CTL	Linfocito T Citotóxico
Da	Dalton
DNA	Acido Desoxiribonucleico
DRiPs	Productos Defectivos de la Síntesis Ribosomal
EA	Espondilitis Anquilosante
RE	Retículo Endoplasmático
ERAP	Aminopeptidasa Asociada al Retículo Endoplasmático
ERp57	Tiol Oxidorreductasa ERp57
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
F	Faradios
FAS	Receptor CD95
FBS	Suero Fetal Bovino
<i>GFP</i>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM	Gangliósido
HC	Cadena Pesada
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano sulfónico
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
htMDM	<i>high throughput Mass Data Manager</i>
INF	Interferón
IT	<i>Ion Trap</i>
LMP2	Proteína de Membrana 2 del Virus Epstein-Barr
LPS	Lipopolisacáridos
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MG132	Carbobenzoxy-L-leucil-L-leucil-L-leucinal
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MS	Espectrometría de Masas
MS/MS	Espectrometría de Masas en Tandem
NQRA	NADH-Quinona Reductasa Transportadora de Na <sup>+</sup> , Subunidad A
O	Ohms
P	DNA primasa
PBS	Tampón Salino de Fosfato
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDI	Disulfuro Isomerasa PDI
PqqC	Proteína Tipo Pirroloquinolina-Quinona Sintasa
ReA	Artritis Reactiva
RNA	Acido Ribonucleico
RPMI	Medio de cultivo celular "Roswell Park Memorial Institute"
RT-PCR	Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
SI	Sistema Inmune
TAP	Transportador Asociado con el Procesamiento Antigénico
TCR	Receptor de Células T
TFA	Trifluoroacético
TH17	Células T <i>helper</i> 17
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TOF	<i>Time of Flight</i>
TPN	Tapasina
TPPII	Tripeptidil Peptidasa II
V	Voltios
VIPR1	Receptor 1 del Péptido Intestinal Vasoactivo



*Indice*



<b>Planteamiento general</b>	<b>3</b>
<b>Introducción</b>	<b>5</b>
I.1 El Sistema Inmune y la discriminación entre lo propio y lo no propio	5
I.2.1 Función y estructura del MHC de Clase I	6
I.2.2 Polimorfismo y especificidad peptídica de HLA-B27	8
I.3 Vía de procesamiento y presentación del MHC de Clase I	9
I.3.1 Procesamiento dependiente de proteasoma	10
I.3.2 Transporte y procesamiento de péptidos en el retículo endoplasmático	11
I.3.3 Ensamblaje y expresión en membrana de las moléculas de MHC de Clase I	11
I.4.1 HLA-B27 y enfermedad	13
I.4.2 HLA-B27, artritis reactiva y bacterias artritogénicas	16
I.5 <i>Chlamydia</i> y hospedador	18
I.6 Mimetismo molecular y autoinmunidad	21
I.7.1 HLA-B27, <i>Chlamydia trachomatis</i> y autoinmunidad	22
I.7.2 HLA-B27 y mimetismo molecular	22
I.8 Bases y estrategia experimental de esta tesis	23
I.8.1 Antecedentes	23
I.8.2 Estrategia experimental	24
<b>Objetivos</b>	<b>26</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>27</b>
M.1.1 Construcciones génicas	27
M.1.2 Transfectantes transitorios y transfectantes estables	28
M.1.3 Anticuerpos	28
M.2 Citometría de flujo	29
M.3 Inmunoprecipitación y Western blot	29
M.4 Microscopía de fluorescencia	30
M.5 Aislamiento de péptidos unidos a HLA-B27	30
M.6 Espectrometría de masas	31
M.7 Secuenciación de péptidos	31
M.8 Marcaje isotópico	33
M.9 Automatización del análisis comparativo de los datos de MS de MALDI-TOF	34
M.10 Búsqueda de homología en bases de datos	35
<b>Resultados</b>	<b>36</b>
<b>Análisis preliminares</b>	<b>36</b>
A.P.1 La transfección del gen de la DNA primasa de <i>Chlamydia trachomatis</i> no resultó en detección de péptidos bacterianos por HLA-B27	36
A.P.2 Selección de los vectores de expresión con <i>GFP</i> fusionada en el extremo N- ó C-terminal de la proteína bacteriana	37
<b>Resultados</b>	<b>39</b>
R.1 Expresión de proteínas de fusión bacterianas en células humanas	39
R.1.1 Diseño y ejecución del modelo experimental	40

R.2 <b>DNA primasa:</b> procesamiento endógeno y presentación de ligandos de HLA-B27 .....	42
R.2.1 Expresión estable de la DNA primasa bacteriana en células C1R-B*2705.....	42
R.2.2 Tres péptidos derivados de P(90-450) son presentados por HLA-B27 en células humanas .....	43
R.2.3 El péptido de <i>Chlamydia trachomatis</i> P(211-221) es procesado endógenamente y presentado por HLA-B27 .....	45
R.2.4 El péptido P(211-222), y otros péptidos relacionados, no se detectaron en el <i>pool</i> peptídico del transfectante P(90-450) .....	46
R.2.5 Dos péptidos adicionales de la DNA primasa de <i>Chlamydia trachomatis</i> son procesados y presentados <i>in vivo</i> por HLA-B27 .....	47
R.2.6 Los péptidos P(112-121) y P(112-122) de <i>Chlamydia trachomatis</i> tienen una alta homología de secuencia con proteínas humanas .....	49
R.2.7 La proteína de fusión P(90-450) se procesa de manera dependiente de proteasoma .....	50
R.3 <b>NQRA:</b> procesamiento endógeno y presentación de ligandos de HLA-B27 .....	51
R.3.1 Expresión estable de la NQRA bacteriana en células C1R-B*2705 .....	52
R.3.2 El único ligando de HLA-B27 de <i>Chlamydia trachomatis</i> detectado específicamente en el transfectante NQRA no está relacionado con el epítipo de células T predicho .....	52
R.3.3 NQRA(330-338) no se presenta por HLA-B27 <i>in vivo</i> .....	54
R.4 <b>PqqC:</b> procesamiento endógeno y presentación de ligandos de HLA-B27 .....	56
R.4.1 Expresión estable de la PqqC bacteriana en células C1R-B*2705 .....	56
R.4.2 Dos péptidos diferenciales son presentados por HLA-B27 en el transfectante de la PqqC.....	57
R.4.3 El epítipo predicho de células T de la PqqC de <i>Chlamydia trachomatis</i> es procesado endógenamente y se presenta por HLA-B27 .....	58
R.4.4 Un ligando diferencial de HLA-B27 no bacteriano en el transfectante PqqC.....	59
R.4.5 Los ligandos bacterianos NQRA(86-94) y PqqC(70-78) poseen una alta homología de secuencia con proteínas humanas .....	59
<b>Discusión.....</b>	<b>61</b>
D.1.1 Alcance y limitaciones del sistema experimental.....	61
D.1.2 Identificación de ligandos de la DNA primasa de <i>Chlamydia trachomatis</i> presentados <i>in vivo</i> por HLA-B27 .....	63
D.1.3 Identificación de ligandos de las proteínas NQRA y PqqC de <i>Chlamydia trachomatis</i> presentados <i>in vivo</i> por HLA-B27 .....	66
D.2 Resumen de los hallazgos principales .....	68
<b>Conclusiones .....</b>	<b>71</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>73</b>
<b>Anexo I:</b> Ligandos de HLA-B27 presentados diferencialmente en células humanas transfectadas con proteínas de <i>Chlamydia trachomatis</i>	
<b>Anexo II:</b> Publicaciones generadas durante el período de elaboración de esta tesis	



# *Introducción*



## Planteamiento general

El mecanismo patogénico que relaciona la presencia de la molécula de HLA-B27 con la infección por *Chlamydia trachomatis* y el desarrollo de artritis reactiva (ReA) se desconoce (Marcilla and Lopez de Castro. 2008). La presente tesis doctoral aborda el estudio de la presentación de péptidos de *Chlamydia trachomatis* por HLA-B27 y su posible relación con el desarrollo de ReA (**Figura 1**). La denominada hipótesis del péptido artritogénico (Benjamin and Parham. 1990) sugiere que la reacción cruzada entre péptidos propios y péptidos bacterianos reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTLs) tras una infección, podría generar autoinmunidad e inflamación. Mediante una aproximación inmunoproteómica se han identificado los primeros ligandos de *Chlamydia trachomatis* procesados y presentados *in vivo* por HLA-B27 (Cragolini and Lopez de Castro. 2008; Cragolini *et al.* 2009) que podrían jugar un papel patogénico en la ReA.

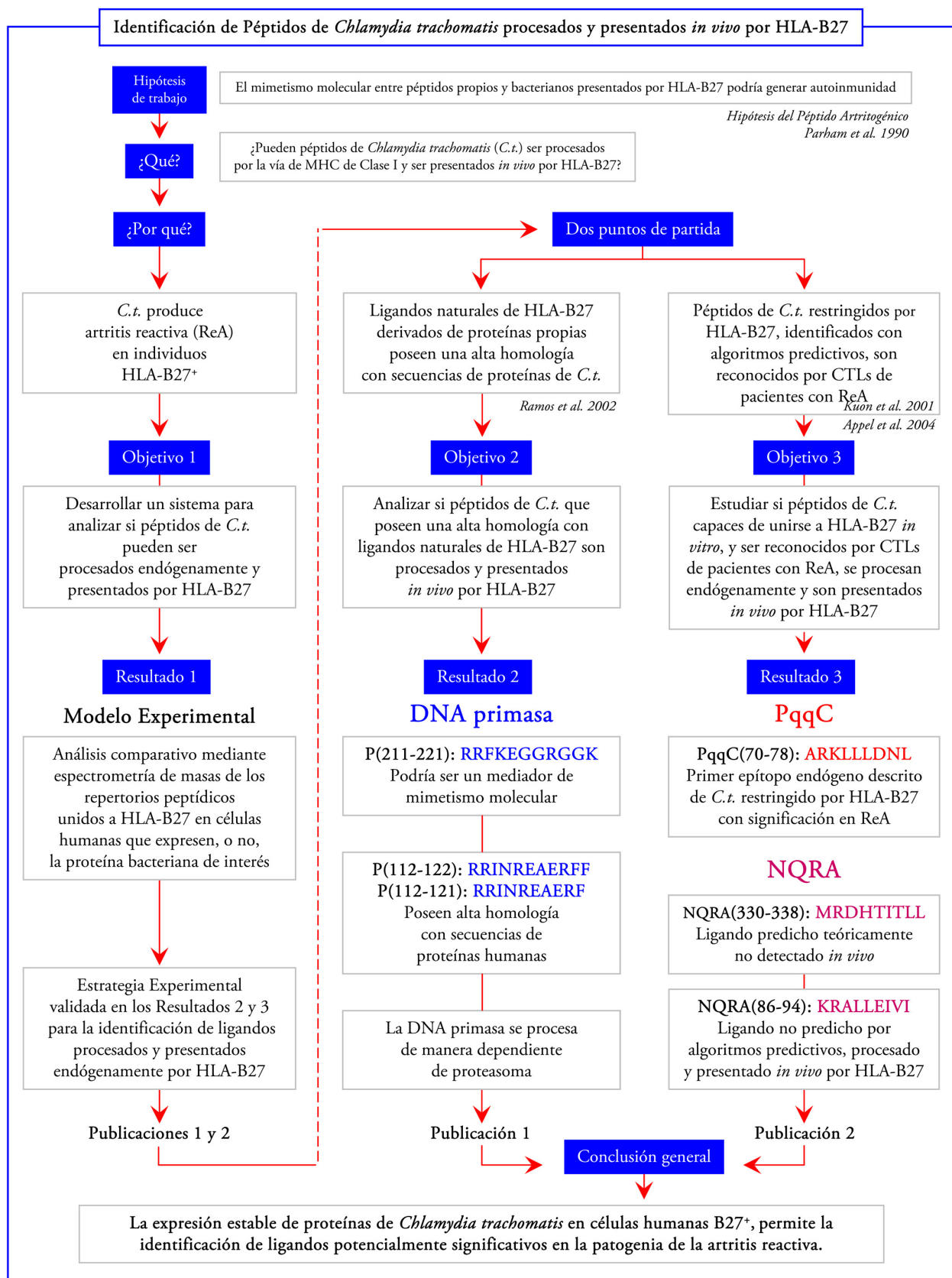


Figura 1. Esquema de la memoria de tesis. Planteamiento general y resumen.

# Introducción

## I.1 El Sistema Inmune y la discriminación entre lo propio y lo no propio

El Sistema Inmune es un conjunto de moléculas, células y órganos especializados, que actúan para defendernos de los microorganismos que nos rodean, y de las transformaciones malignas que afectan a las células de nuestro organismo. Dependiendo de los hábitos de vida de cada patógeno, éstos inducen una respuesta que afecta de múltiples maneras a los diferentes componentes del Sistema Inmune, dando lugar a procesos de una enorme complejidad. La inmunidad innata genera las primeras barreras de defensa contra las infecciones, conteniéndolas, otorgando tiempo e iniciando mecanismos efectores para la iniciación de funciones más eficientes y especializadas de la inmunidad adquirida. Ambas actúan coordinadamente para proteger al hospedador.

El éxito de esta compleja organización consiste en ejercer de manera efectiva varias funciones principales. Primero, el reconocimiento inmunológico: la presencia de “lo no propio” debe ser detectada. Segundo, contener y eliminar la infección, a través de las funciones efectoras del Sistema Inmune tales como la capacidad destructiva específica de los CTLs y la producción de anticuerpos de los linfocitos B. Tercero, prevenir el daño contra “lo propio”, para lo cual la respuesta inmune debe ser debidamente controlada y regulada. El fallo de los procesos de regulación inmune puede producir fenómenos de autoinmunidad. Cuarto, generar una capacidad de respuesta optimizada, cualitativa y temporalmente, frente a una nueva exposición al mismo agente: la memoria inmunológica.

Idealmente, las funciones efectoras del Sistema Inmune deben atacar exclusivamente a los agentes infecciosos foráneos y no a los tejidos propios. En la práctica, debido a que las proteínas propias y las no propias son químicamente similares, la discriminación entre “lo propio” y “lo no propio” no es un proceso perfecto. Tanto a nivel central como a nivel periférico, existen una variedad de mecanismos de tolerancia para regular y eliminar células o anticuerpos potencialmente autoreactivos. En parte, la autoreactividad ocurre debido a que el reconocimiento de lo propio es indirecto. Más aún, algunos de los componentes celulares o humorales autoreactivos podrían ser específicos contra antígenos foráneos. En consecuencia si estos componentes fuesen eliminados, la efectividad del Sistema Inmune se vería disminuida.

La autoinmunidad representa el fallo en los mecanismos de tolerancia hacia lo propio. En general, existen varios requerimientos para el desarrollo de una enfermedad autoinmune, los cuales incluyen factores genéticos, medioambientales, infecciosos y de regulación inmune. Así, en individuos

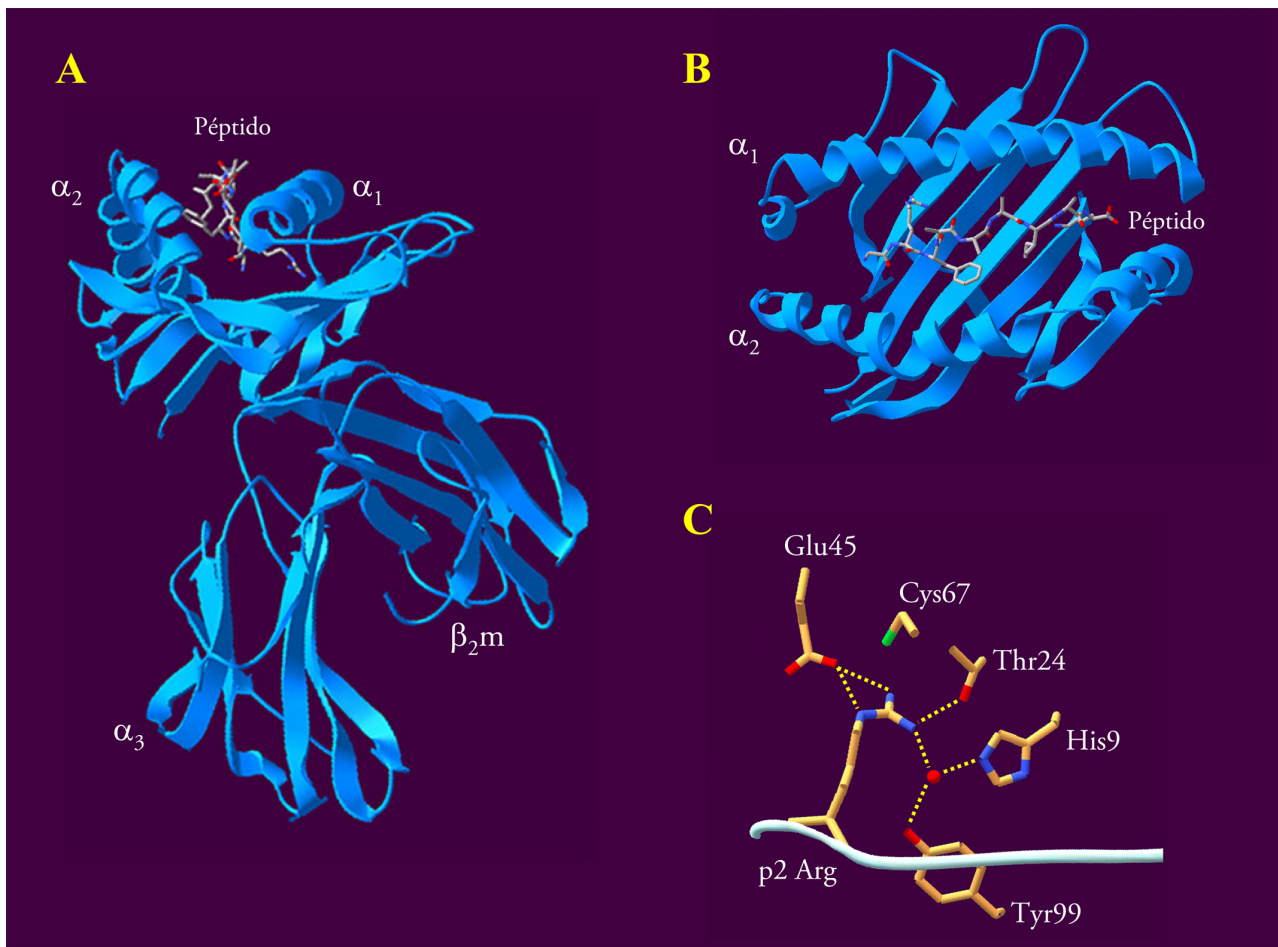
genéticamente predispuestos, los fenómenos de autoinmunidad pueden ser inducidos como resultado de la exposición a diferentes agentes infecciosos. Algunos patógenos contribuyen a promover autoinmunidad a través de reacciones inflamatorias no específicas. Asimismo, ciertos patógenos pueden generar respuestas autoinmunes, si estos expresan moléculas “no propias” semejantes a las moléculas “propias” del hospedador, un fenómeno conocido como mimetismo molecular.

Entre los múltiples mecanismos del Sistema Inmune implicados en garantizar la protección del individuo, los CTLs son capaces de detectar la presencia de patógenos intracelulares a través del receptor de células T (TCR). Este reconoce péptidos unidos a unas glicoproteínas de membrana especializadas, conocidas como antígenos de histocompatibilidad o moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de Clase I. La presencia de un péptido extraño en el contexto de una molécula de MHC de Clase I conduce a la activación de los CTLs específicos con capacidad de destruir por citolisis o apoptosis la célula infectada.

### I.2.1 Función y estructura del MHC de Clase I

La función principal de las moléculas de MHC de Clase I es presentar péptidos endógenos, generados principalmente en el citosol, a las células T CD8<sup>+</sup>. Las moléculas del MHC de Clase I están formadas por la asociación no covalente entre dos cadenas polipeptídicas, una cadena pesada (HC) o cadena  $\alpha$  de 44 kDa, y una cadena más pequeña o  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ ) de 12 kDa, y un péptido de entre 8 y 13 aminoácidos (**Figura 2A**). La caracterización estructural de los complejos MHC-(Bjorkman *et al.* 1987a; Bjorkman *et al.* 1987b; Garrett *et al.* 1989; Madden *et al.* 1991; Saper *et al.* 1991; Guo *et al.* 1992; Madden *et al.* 1993; Madden. 1995) péptido mediante técnicas cristalográficas ha permitido analizar en detalle tanto la estructura de las moléculas de MHC, como la forma en que éstas unen ligandos peptídicos. La cadena  $\alpha$  consta de una región extracelular de 274 aminoácidos, una porción transmembrana de unos 25 residuos y una región citoplasmática de alrededor de 30. La molécula completa posee 4 dominios: 3 formados por la HC ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ) y uno formado por la  $\beta_2m$  (Orr *et al.* 1979). Los dominios  $\alpha_3$  y  $\beta_2m$  se pliegan en una estructura similar a los dominios constantes de las inmunoglobulinas. En cambio, los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  conforman una cavidad que permite la unión de péptidos en su interior (25 Å de longitud y 12 Å de ancho). Ocho bandas antiparalelas a modo de base y 2 hélices  $\alpha$  forman el sitio de unión de péptidos (**Figura 2B**). La  $\beta_2m$  adopta una conformación homóloga a  $\alpha_3$  y establece interacciones con dicho dominio así como con  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  contribuyendo significativamente a la estabilidad de la molécula (Madden. 1995). Estructuralmente, la unión de los

péptidos conforma una parte integral de las moléculas de Clase I ya que éstas sin péptidos unidos son altamente inestables (Ljunggren *et al.* 1990; Bouvier. 2003).



**Figura 2. Estructura de HLA-B27.** A.- Vista lateral de la molécula de HLA-B27. Se muestran los tres dominios de la cadena pesada (α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub> y α<sub>3</sub>), la β<sub>2</sub>m y el péptido. Sólo se representa la porción extracelular. B.- Vista apical de la cavidad de unión de péptido. Este se representa mediante el código de color CPK (carbono en gris, oxígeno en rojo y nitrógeno en azul). C.- Interacción entre los residuos de la subcavidad B de HLA-B\*2705 y la arginina en posición 2 del péptido. El esqueleto del péptido se representa en blanco y las interacciones entre residuos en línea discontinua amarilla (Madden *et al.* 1992; Hulsmeier *et al.* 2002).

La unión de los péptidos a las moléculas de MHC se estabiliza principalmente mediante puentes de hidrogeno e interacciones iónicas, entre los extremos libres N-terminales y C-terminales del péptido, y los residuos conservados en la cavidad de unión de las moléculas de MHC (Bouvier and Wiley. 1994). En consecuencia, estas interacciones limitan la longitud de los péptidos que pueden unirse a las moléculas de MHC de clase I. Además, en la cavidad de unión de péptidos, existen una serie de subcavidades cuya naturaleza química y estructura vienen determinadas por las cadenas laterales de los residuos que las componen (Garrett *et al.* 1989; Saper *et al.* 1991). La interacción de algunos de los residuos del péptido, denominados residuos de anclaje con estas subcavidades contribuye críticamente en la especificidad de unión MHC/péptido. La mayor parte del polimorfismo descrito entre las moléculas de MHC de Clase I se halla en los dominios α<sub>1</sub> y α<sub>2</sub> (Lopez de Castro *et al.* 1983; Young *et al.* 1995a;

Young *et al.* 1995b), y afecta al tamaño, la configuración y la naturaleza química de las subcavidades. En consecuencia, la especificidad de unión de un alotipo en concreto varía en función de su estructura primaria (Falk *et al.* 1991).

La habilidad de las células T para reconocer su antígeno específico a través de moléculas de MHC, y responder contra él, es una característica central de la inmunidad adaptativa (Rudolph and Wilson. 2002). Los linfocitos T reconocen péptidos presentados por las moléculas de MHC de Clase I a través del complejo TCR-CD3 (Marrack *et al.* 2008), compuesto por dímeros TCR $\alpha\beta$ , CD3 $\gamma\epsilon$ , CD3 $\delta\epsilon$  y TCR $\zeta\zeta$ , los cuales no están covalentemente unidos entre sí. El complejo CD3 y la cadena  $\zeta$  tienen dominios de activación con motivos de tirosina ITAM (Reth. 1989). La orientación del TCR es diagonal al eje del péptido, para compensar la disposición ligeramente elevada en sus extremos N-terminales de las 2 hélices de la molécula de Clase I (Chien and Davis. 1993; Davis and Chien. 1993). Las cadenas  $\beta$  y  $\alpha$  del TCR, a través de las regiones CDR1 y CDR2, interaccionan con las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de la molécula de Clase I, y con los extremos C y N-terminales del péptido unido, respectivamente. Las regiones CDR3, tanto de la cadena  $\alpha$  como de la  $\beta$ , se posicionan sobre la parte central del péptido unido (Garboczi *et al.* 1996).

### I.2.2 Polimorfismo y especificidad peptídica de HLA-B27

Existen cientos de diferentes versiones o “alelos” en cada uno de los tres loci (HLA-A, B y C) que codifican para las moléculas de MHC de Clase I en la población humana. De hecho, el MHC es una de las regiones más polimórficas del genoma humano (Murphy *et al.* 2008). La mayoría de las diferencias entre alotipos se encuentran en posiciones del sitio de unión, que afectan a la interacción con el péptido. Por ende, los diferentes alotipos MHC unen diferentes repertorios de péptidos. El conjunto de péptidos que se une a un alotipo MHC dado, posee residuos iguales o similares en dos o tres posiciones fijas de su secuencia peptídica (Murphy *et al.* 2008). Estos residuos, denominados posiciones de anclaje, interaccionan con las distintas subcavidades del sitio de unión de péptidos (Jardetzky *et al.* 1991; Falk *et al.* 1991; Rammensee *et al.* 1993; Huczko *et al.* 1993; Lopez de Castro *et al.* 2004). Tanto la identidad como la posición de estos residuos de anclaje pueden variar en función de cada alotipo, sin embargo la mayoría de los péptidos que se unen a las moléculas de MHC de Clase I presentan residuos hidrofóbicos o, menos frecuentemente, básicos en el extremo C-terminal (Govindarajan *et al.* 2003). El resto de posiciones del péptido muestran mayor variabilidad de residuos, permitiendo a un único alotipo unir miles de péptidos, lo que posibilita la presentación de una gran diversidad de epítopos a las células T.



En concreto, la molécula de HLA-B\*2705 tiene una preferencia casi absoluta por péptidos con Arg en posición 2 (p2) (Jardetzky *et al.* 1991; Madden *et al.* 1992; Lopez de Castro *et al.* 2004), constituyendo su principal posición de anclaje (**Figura 2 C**). Menos frecuentemente, B\*2705 puede unir ligandos con Gln en p2 (Alvarez *et al.* 2001a). La estructura y polaridad de la subcavidad B de B27, y principalmente el residuo Glu45, que interacciona con la cadena lateral del residuo de Arg del péptido unido, determinan que éste sea un residuo de anclaje primordial (Madden *et al.* 1992) (Figura 2C). La segunda posición de anclaje principal es la C-terminal (pΩ), que en B\*2705 permite residuos básicos, alifáticos y aromáticos (Lopez de Castro *et al.* 2004), lo cual es posible debido a la estructura de la subcavidad F, que posibilita una notable plasticidad en la interacción con el residuo C-terminal (Madden *et al.* 1992). Además, existen otras posiciones de anclaje secundarias: p1, p3 y p7. El análisis de los ligandos naturales de HLA-B\*2705, permitió identificar ciertos residuos que poseen una alta frecuencia en estas posiciones de anclaje secundarias: Gly o residuos básicos (principalmente Arg) en p1, residuos alifáticos o aromáticos (excepto Ala) en p3, y una mayor variabilidad con predominio de Tyr y Ile en p7 (Lopez de Castro *et al.* 2004).

### 1.3 Vía de procesamiento y presentación del MHC de Clase I

La tolerancia a “lo propio” por parte del sistema inmunológico requiere la presentación continua de péptidos a las células T, los cuales son procesados en el interior celular (Wearsch and Cresswell. 2008). La principal tarea de la ruta endógena de MHC de Clase I es procesar y presentar constitutivamente en la superficie celular ligandos peptídicos, que derivan mayoritariamente de proteínas endógenas citosólicas y nucleares. De esta forma, las células T circulantes pueden distinguir, entre péptidos derivados de proteínas propias o péptidos derivados de patógenos intracelulares (Pamer and Cresswell. 1998; Rock and Goldberg. 1999). Se han propuesto dos fuentes primarias que proveen ligandos a las moléculas de MHC de Clase I. Primero, proteínas maduras que son ubiquitinadas y degradadas al final de su vida útil. Segundo, productos defectivos de la síntesis proteica (*defective ribosomal products*: DRiPs) generados por el ribosoma (Yewdell *et al.* 1996; Reits *et al.* 2000; Qian *et al.* 2006b). Esta segunda fuente contribuye de manera significativa al aporte de péptidos de esta vía, posibilitando respuestas tempranas a infecciones víricas. En este caso, el uso de DRiPs como fuente de antígenos acelera notoriamente el tiempo de respuesta del Sistema Inmune. Cualitativamente, se ha estimado que el 30% de las proteínas sintetizadas en la célula podrían ser degradadas cotraduccionalmente antes de completar su síntesis (Yewdell *et al.* 2003). En concordancia con este hecho, se ha postulado la existencia de mecanismos de acoplamiento entre la síntesis proteica y el proteasoma, que podrían favorecer la degradación de proteínas de nueva síntesis y así, aumentar la

eficiencia de la presentación de antígeno por moléculas de Clase I (Yewdell and Nicchitta. 2006; Voigt *et al.* 2007).

### I.3.1 Procesamiento dependiente de proteasoma

El proteasoma es la principal proteasa implicada en la generación de ligandos de las moléculas de Clase I (Rock *et al.* 1994). Existen tres actividades proteolíticas principales en el proteasoma: tríptica, tras residuos básicos, quimotríptica, tras residuos hidrofóbicos, y caspasa, tras residuos ácidos. Para bloquear significativamente la degradación de proteínas es necesaria la inhibición de, al menos, dos de estas actividades (Kisselev *et al.* 2006). El núcleo catalítico del proteasoma corresponde a la subunidad 20S, la cual posee su actividad enzimática en las subunidades  $\beta$ , y se asocia con la subunidad reguladora 19S, formando el proteasoma 26S. Funcionalmente, el proteasoma puede existir en dos formas: como “proteasoma”, constitutivamente expresado en todas las células, o como “inmunoproteasoma”, hallado en células estimuladas con interferones (IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ ) y TNF- $\alpha$ , en el cual las tres subunidades inducidas ( $\beta$ 1i,  $\beta$ 2i y  $\beta$ 5i) reemplazan a las subunidades del proteasoma constitutivo (Groettrup *et al.* 1997; Griffin *et al.* 1998; Loukissa *et al.* 2000; Jamaluddin *et al.* 2001; Kuckelkorn *et al.* 2002). Además, el proteasoma 20S puede asociarse con diversos complejos reguladores (19S o PA700, 11S o PA28) (Rock *et al.* 2004), cuyas funciones no están completamente definidas en la ruta de procesamiento y presentación de MHC de Clase I (Qian *et al.* 2006a; Voigt *et al.* 2007).

El proteasoma genera directamente el extremo C-terminal de los ligandos de MHC de Clase I (Dick *et al.* 1991; Boes *et al.* 1994; Eggers *et al.* 1995; Dick *et al.* 1996; Serwold and Shastri. 1999; Yague *et al.* 2000; Alvarez *et al.* 2001b; Lopez *et al.* 2006). Por otra parte, el corte en el extremo N-terminal puede no ser preciso generándose en muchos casos precursores extendidos. Para adquirir el tamaño adecuado para su unión a las moléculas de Clase I, estos precursores requieren un procesamiento posterior por aminopeptidasas (Saveanu *et al.* 2005a) del citosol y del retículo endoplasmático (RE). En la vía de procesamiento de MHC de Clase I, se caracterizó una aminopeptidasa asociada al retículo endoplasmático (ERAP) capaz de realizar *trimming* de los precursores peptídicos con extensiones N-terminales (Saveanu *et al.* 2005a). Además del proteasoma, otras proteasas parecen tener algún papel en la generación y/o en la destrucción de ciertos epítomos puntuales (Gil-Torregrosa *et al.* 1998; Gil-Torregrosa *et al.* 2000; Shen *et al.* 2004). Estas observaciones descritas para ligandos concretos, no parecen compatibles con una contribución global relevante al repertorio peptídico presentado por las moléculas de MHC de Clase I. Tampoco explican los niveles de independencia de proteasoma observados en algunos alotipos, incluyendo HLA-B\*2705 (Luckey *et al.* 2001; Marcilla *et al.* 2007). En

particular, se describió que la aminopeptidasa citosólica tripeptidil peptidasa II (TPPII), podría tener un papel importante en la generación de ligandos de MHC de Clase I (Reits *et al.* 2004). Sin embargo, la falta de reproducibilidad de los experimentos donde originalmente se describió dicho fenómeno, y otras evidencias experimentales sugieren que esta enzima tampoco tiene un papel global significativo en la generación de ligandos de MHC de Clase I (York *et al.* 2006; Marcilla *et al.* 2008; van Endert. 2008).

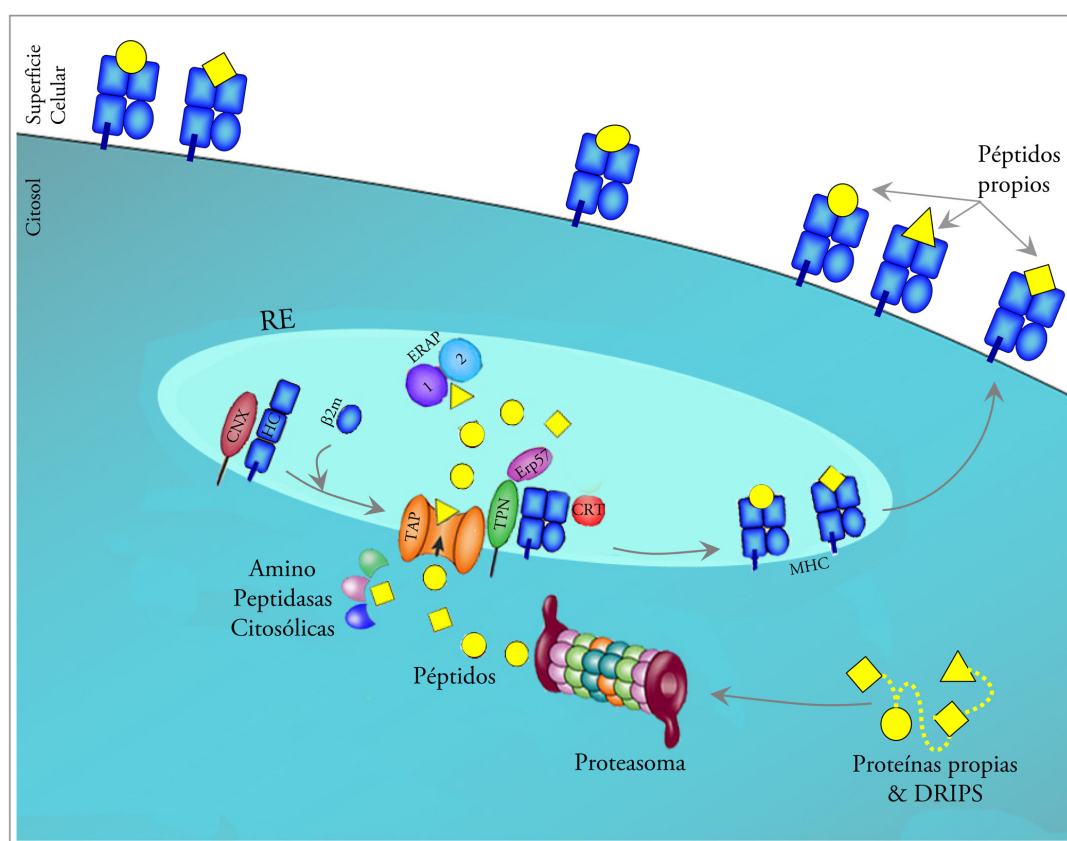
### **I.3.2 Transporte y procesamiento de péptidos en el retículo endoplasmático**

Los péptidos son transportados desde el citosol al RE a través de una proteína de membrana dependiente de ATP, llamada transportador asociado con el procesamiento antigénico (TAP) perteneciente a la familia de proteínas ABC (ATP binding cassette) (Monaco *et al.* 1990; Deverson *et al.* 1990; Spies *et al.* 1990; Trowsdale *et al.* 1990), la cual está formada por las subunidades TAP1 y TAP2 (Vos *et al.* 1999). Los genes de TAP se encuentran en el MHC y su expresión se induce en presencia de IFN- $\gamma$  (Lankat-Buttgereit and Tampe. 2002). Al deletarse cualquiera de estas dos subunidades se produce una inhibición casi total de la expresión de moléculas de Clase I en la superficie celular (de la Salle *et al.* 1994). El complejo TAP humano transporta de modo preferente péptidos de entre 8 y 16 aminoácidos (Momburg *et al.* 1994), con residuos C-terminales básicos, hidrofóbicos y aromáticos. La unión de péptidos con un residuo C-terminal ácido esta altamente desfavorecida (Daniel *et al.* 1998; Uebel and Tampe. 1999). Adicionalmente, la eficiencia del proceso de translocación se ve modulada por la secuencia del péptido, fundamentalmente por los tres residuos N-terminales y el residuo C-terminal (Momburg *et al.* 1994). Las preferencias de transporte de TAP concuerdan con la especificidad de corte del proteasoma y con la especificidad de las moléculas de MHC de Clase I de unir péptidos con extremos C-terminales hidrofóbicos y básicos, sin embargo son inconsistentes con los requisitos estrictos en el tamaño de los péptidos unidos a MHC de Clase I. El recorte N-terminal o *trimming* de los precursores que alcanzan el RE se lleva a cabo por ERAP1 (Serwold *et al.* 2001; York *et al.* 2002; Saric *et al.* 2002; Serwold *et al.* 2002), la cual está asociada físicamente a ERAP2 (Saveanu *et al.* 2005b), otra aminopeptidasa que posee funciones complementarias a ERAP1 (Tanioka *et al.* 2003).

### **I.3.3 Ensamblaje y expresión en membrana de las moléculas de MHC de Clase I**

En el RE los péptidos se unen a la HC y a la  $\beta_2m$  en un proceso de carga asistida altamente organizado, que implica la participación de varias chaperonas (**Figura 3**) (Wiertz *et al.* 1996; Wearsch and Cresswell. 2008). La HC se inserta cotraduccionalmente en el RE, asociándose con la calnexina, que favorece el plegamiento y promueve la interacción con la  $\beta_2m$  (Vassilakos *et al.* 1996; Paulsson and Wang. 2003). La calnexina es sustituida por la calreticulina en un proceso dependiente de  $\beta_2m$

(Sadasivan *et al.* 1996; Vassilakos *et al.* 1996). El heterotrímero formado por HC,  $\beta_2m$  y calreticulina junto con la tiol oxidorreductasa ERp57 (Hughes and Cresswell. 1998; Lindquist *et al.* 1998; Morrice and Powis. 1998; Lindquist *et al.* 2001), quizá la disulfuro isomerasa PDI (Park *et al.* 2006) aunque ello no ha sido confirmado por otros grupos (Dong *et al.* 2009), tapasina y TAP, forman el llamado complejo de carga peptídico. La tapasina actúa de puente entre el resto del complejo y TAP (Sadasivan *et al.* 1996; Ortmann *et al.* 1997), y está unida covalentemente a la ERp57, con quien forma una subunidad funcional dentro del complejo de carga (Dong *et al.* 2009) de forma que la optimización de la unión de péptidos está concertada en la formación de los enlaces disulfuro intracatenarios de la HC.



**Figura 3. Ruta de procesamiento y presentación de las moléculas del MHC de clase I.** Los péptidos generados en el citosol (amarillo), principalmente por el proteasoma, son transportados vía TAP al lumen del retículo endoplasmático (RE) donde se asocian con la cadena pesada (HC) y la  $\beta_2m$ . Este proceso está facilitado por la formación de un complejo de carga que incluye TAP (anaranjado), tapasina (TPN: verde), calreticulina (CRT: rojo) y ERp57 (violeta). La unión de un ligando de alta afinidad induce la disociación del complejo de carga y la molécula de clase I (azul) es exportada a la superficie. Calnexina (CNX).

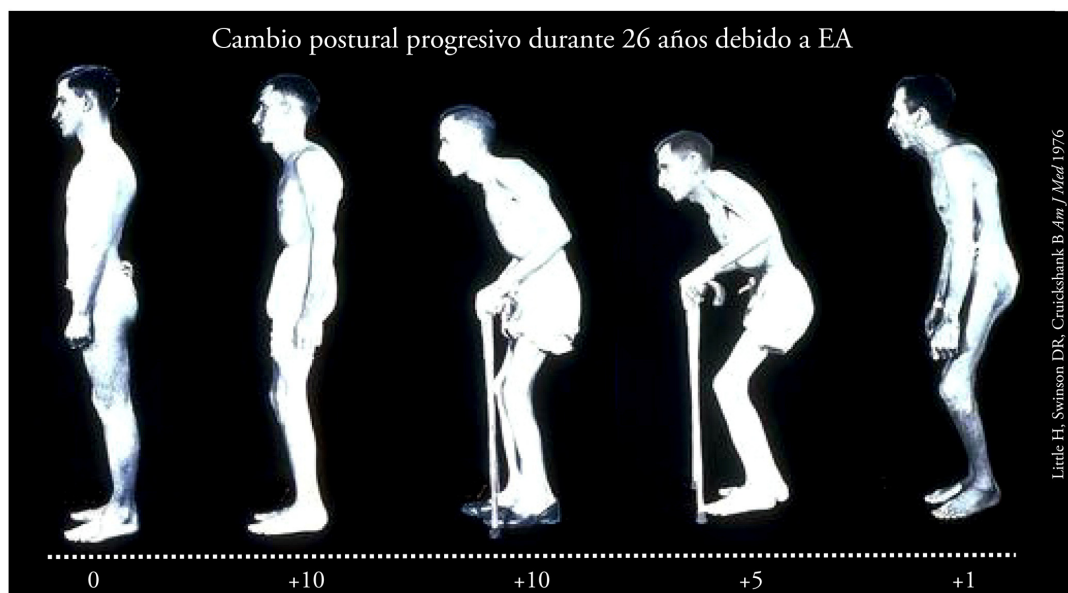
Aunque la conformación nativa de las proteínas depende de su estructura primaria, en el RE se producen una serie de eventos cruciales destinados al control de calidad, donde por un lado se verifica el correcto plegamiento de las proteínas que van a ser exportadas, y por otro lado, se retienen y degradan de manera selectiva aquellas proteínas plegadas de forma anómala (Anfinsen. 1973; Ellgaard and Helenius. 2001; Sitia and Braakman. 2003). Adicionalmente, la HC sufre diferentes glicosilaciones durante el

proceso de plegamiento y maduración en el RE (Hirsch *et al.* 2003), que posibilitan y regulan su interacción con calnexina y calreticulina, dos chaperonas de tipo lectina.

La unión de un ligando peptídico con suficiente afinidad al heterodímero parcialmente plegado produce la disociación del complejo de carga. Finalmente, las moléculas de MHC Clase I formadas se exportan a la membrana plasmática.

#### I.4.1 HLA-B27 y enfermedad

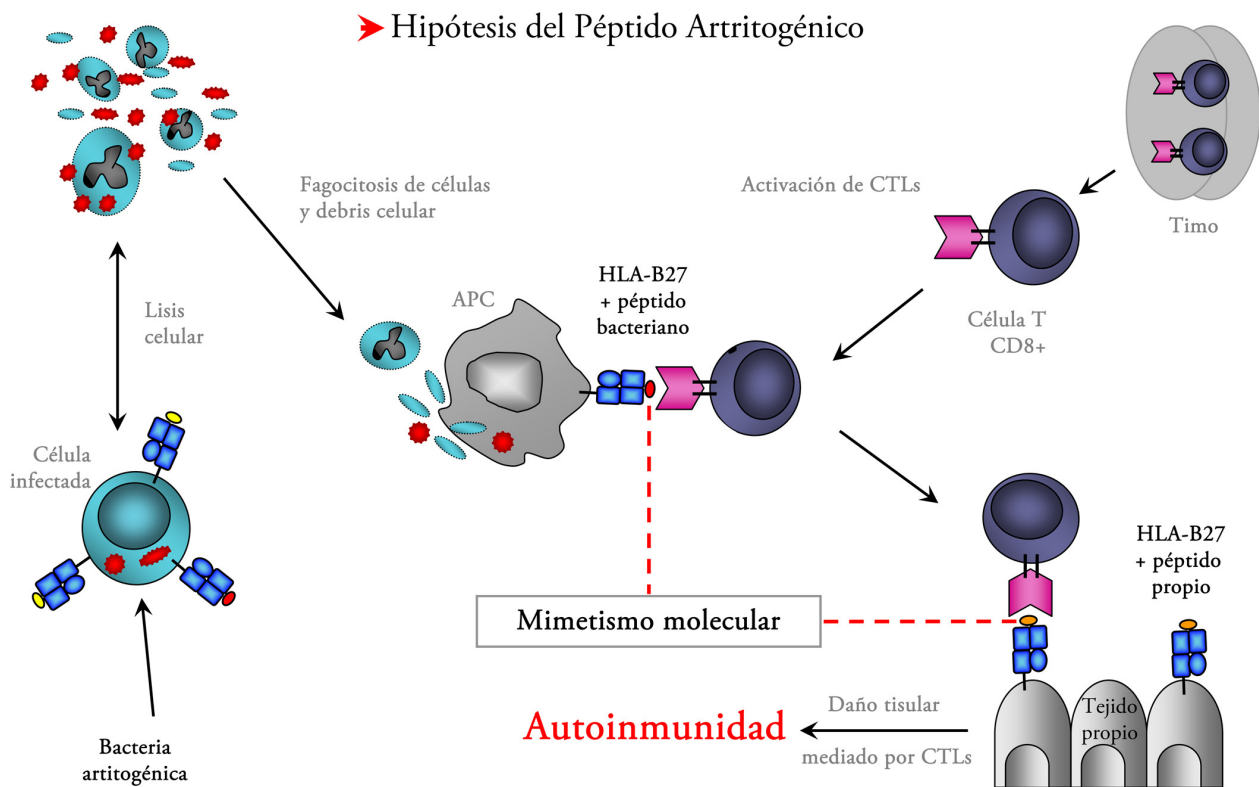
Entre las moléculas de MHC de Clase I humanas, HLA-B27 tiene una importancia fundamental por estar fuertemente asociada a un grupo de enfermedades reumáticas denominadas espondiloartropatías, incluyendo Espondilitis Anquilosante (EA) (Brewerton *et al.* 1973b) y ReA (Brewerton *et al.* 1973a) (**Figura 4**). Esta asociación es una de las más fuertes descritas entre una molécula de MHC de Clase I y una enfermedad. La prevalencia de HLA-B27 en EA se ha estimado en un 95% (Ramos and Lopez de Castro. 2002), mientras que en la población caucásica la frecuencia de este alelo es aproximadamente entre el 4-8%. Hasta la fecha, se han descrito 45 subtipos de HLA-B27 relacionados estructuralmente entre sí, los cuales evolucionaron a partir de un subtipo común, posiblemente HLA-B\*2705, siendo este subtipo el más ampliamente distribuido y el más frecuente entre la población caucásica (Ramos and Lopez de Castro. 2002).



**Figura 4. HLA-B27 y espondiloartropatías.** Las espondiloartropatías, que incluyen la espondilitis anquilosante (EA) y la artritis reactiva (ReA), son enfermedades inflamatorias crónicas que afectan las articulaciones, principalmente el esqueleto axial, debido a un proceso de osteogénesis que produce anquilosis. Se muestra el cambio postural en un individuo con EA durante un período de 26 años. Modificada a partir de (Little *et al.* 1976).

Tres argumentos principales apoyan la idea de que HLA-B27 está directamente implicado en la patogenia de las espondiloartropatías. Primero, la molécula de HLA-B27 está asociada a EA en diferentes

poblaciones y en distintos grupos étnicos, y además en el contexto de diferentes haplotipos (Gonzalez-Roces *et al.* 1997). Segundo, algunos de los subtipos naturales de HLA-B27 no están asociados a EA, sugiriendo que el polimorfismo de los distintos subtipos esta modulando de alguna manera la susceptibilidad a la enfermedad (D'Amato *et al.* 1995; Lopez-Larrea *et al.* 1995; Ren *et al.* 1997; Nasution *et al.* 1997; Paladini *et al.* 2005). Tercero, las ratas transgénicas HLA-B27<sup>+</sup>, que poseen un fondo genético y un número de copias del transgen adecuados, desarrollan una enfermedad similar a las espondiloartropatías (Hammer *et al.* 1990; Taurog *et al.* 1993).



**Figura 5. Hipótesis del péptido artrítico** (Benjamin and Parham. 1990). El mimetismo molecular entre péptidos propios y péptidos bacterianos puede producir autoinmunidad. Una bacteria artrítica infecta una célula humana produciendo apoptosis y/o lisis celular. Las células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, son capaces de fagocitar estos cuerpos apoptóticos y el desecho celular, y presentar péptidos bacterianos unidos a HLA-B27. La reacción cruzada entre un péptido bacteriano y un péptido propio puede desencadenar, a través del daño tisular mediado por CTLs, una respuesta autoinmune contra células propias. A partir de (Ramos and Lopez de Castro. 2002).

Actualmente existen 4 hipótesis principales que intentan explicar la asociación de HLA-B27 con EA (Marcilla and Lopez de Castro. 2008), basadas en diferentes características moleculares: 1) la hipótesis del plegamiento anómalo de la HC, según la cual se produciría una reacción inflamatoria tras una respuesta de estrés de RE por la acumulación de HC de B27 mal plegada (Mear *et al.* 1999; Colbert. 2000b; Colbert. 2000a; Kingsbury *et al.* 2000), 2) la hipótesis de los homodímeros de superficie, la cual propone que a través del reconocimiento de formas anómalas de B27, carentes de  $\beta_2m$ , se podría inducir la activación de una respuesta inflamatoria como consecuencia de una respuesta inmune anómala (Allen

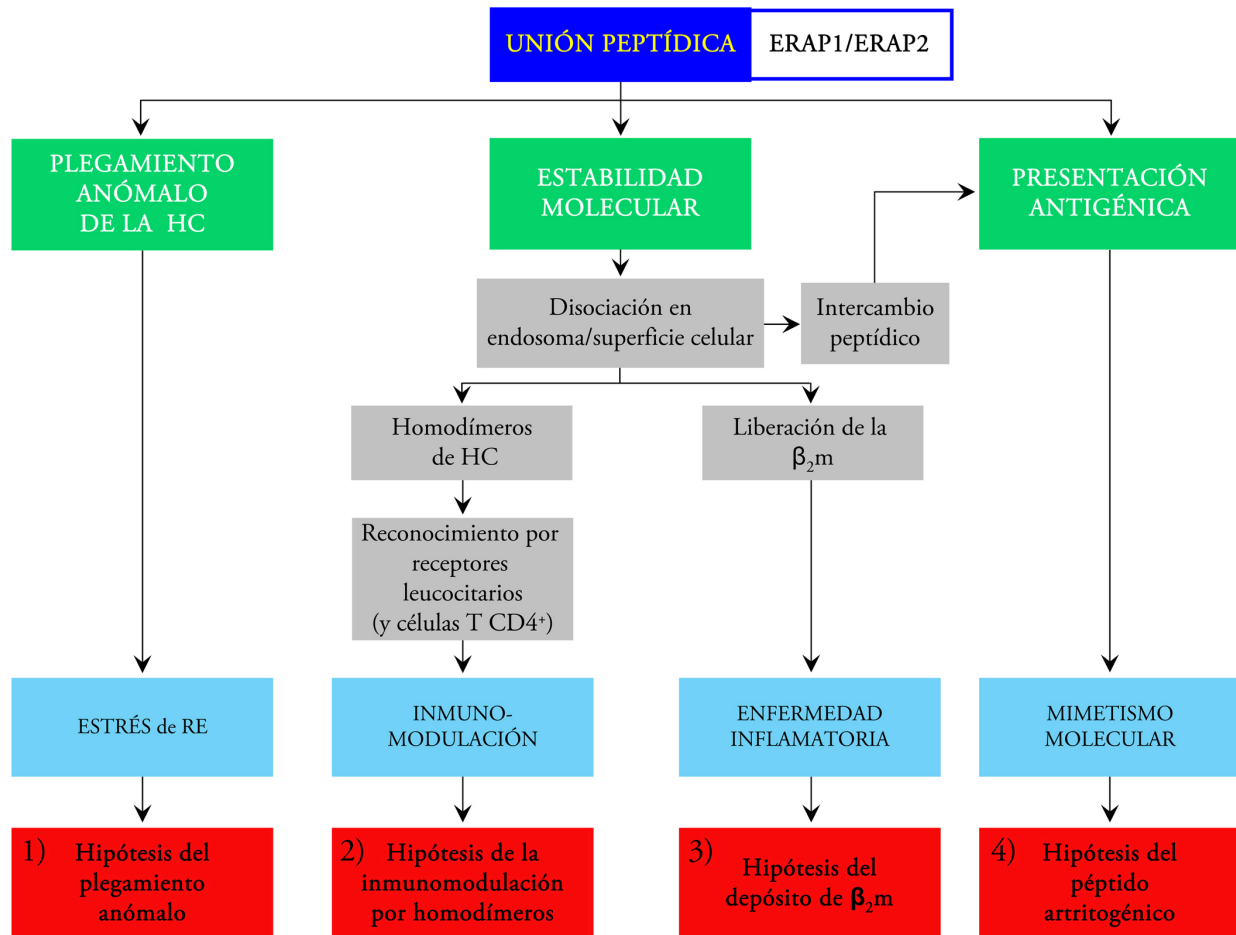
*et al.* 1999; Edwards *et al.* 2000), 3) la hipótesis del depósito de  $\beta_2m$ , donde el potencial inflamatorio de la  $\beta_2m$  libre depositada en el tejido sinovial sería el mecanismo responsable de la inflamación (Uchanska-Ziegler and Ziegler. 2003). 4) Por último, la hipótesis del péptido artrítico (Benjamin and Parham. 1990), que constituye la hipótesis de trabajo de la presente tesis doctoral, se basa en la función canónica de HLA-B27 como molécula presentadora de péptidos a las células T, el concepto de mimetismo molecular, y la idea de que una activación de respuestas de células T por medio de un antígeno externo puede producir autoinmunidad (**Figura 5**). Cabe aclarar que las tres primeras hipótesis mencionadas se basan en características distintas de la propiedad fundamental de las moléculas de MHC de Clase I: la capacidad de presentación de péptidos antigénicos.

Según la hipótesis del péptido artrítico, el mimetismo molecular entre péptidos propios y péptidos bacterianos presentados por HLA-B27 tras una infección bacteriana, podría generar una reacción cruzada de CTLs, rompiendo la tolerancia contra ciertos péptidos propios, produciendo daño tisular y autoinmunidad.

Recientemente se han descrito, mediante análisis metagenómicos de población, la asociación de dos genes no-B27 adicionales con EA: 1) el gen que codifica para el receptor de la IL23, IL23R, y 2) el gen que codifica para ERAP1 (Burton *et al.* 2007). El primero de estos genes, codifica para un receptor de citoquinas que se expresa en una población de células T *helper* 17 ( $T_{H17}$ ), la cual libera la citoquina proinflamatoria IL-17 (Park *et al.* 2005). Por su parte, ERAP1 puede actuar induciendo la desaparición de la membrana celular de diferentes receptores de citoquinas proinflamatorias (*shedding*), tales como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  (Cui *et al.* 2002; Cui *et al.* 2003b; Cui *et al.* 2003a). Además, como ya se ha comentado, esta aminopeptidasa tiene un papel fundamental en el *trimming* de los péptidos producidos por el proteasoma, generando ligandos de un tamaño compatible con las preferencias de unión de las moléculas de MHC de Clase I (Saric *et al.* 2002; Serwold *et al.* 2002). En consecuencia, es primordial analizar en profundidad la función de estos genes en relación con HLA-B27, especialmente de ERAP1, la cual podría estar modulando el procesamiento antigénico, y por este mecanismo contribuir a la patogenia de las espondiloartropatías asociadas a HLA-B27.

Si bien la asociación de HLA-B27 con EA se describió hace más de 30 años, ninguna de las hipótesis patogénicas ha logrado explicar satisfactoriamente la base molecular de dicha asociación, a pesar de los avances significativos en la elucidación de la estructura, la bioquímica, la inmunología y los repertorios peptídicos de B27. La coexistencia de las cuatro hipótesis mencionadas refleja la complejidad del campo y la necesidad de un marco de investigación que integre a todas ellas. La estrategia experimental más adecuada para analizar el papel patogénico de HLA-B27 debe incluir una perspectiva

global, abarcando tanto el análisis de su inmunobiología, como la caracterización de las múltiples propiedades moleculares y sus interdependencias, además de la posible influencia de algunos genes no-B27 que podrían contribuir a la génesis de la enfermedad (Marcilla and Lopez de Castro. 2008). Desde esta perspectiva, la unión de péptidos surge como una propiedad fundamental de HLA-B27, de la cual dependen en mayor o menor medida, el resto de las propiedades bioquímicas de esta molécula (**Figura 6**).



**Figura 6. Papel central de la especificidad peptídica de HLA-B27.** La unión peptídica tiene un papel central en la determinación de las propiedades moleculares y funcionales de HLA-B27. Se han propuesto diferentes hipótesis (rectángulos rojos) en base a distintas características moleculares (rectángulos verdes). Estas intentan explicar a través de diferentes mecanismos patogénicos (rectángulos celestes), el desarrollo de las espondiloartropatías asociadas a HLA-B27. La unión de péptidos (rectángulo azul) afecta de manera significativa a cada una de las características de HLA-B27. Además, la unión peptídica esta modulada por la acción de diferentes proteínas de la vía de MHC de Clase I, incluyendo las aminopeptidasas ERAP1 y ERAP2.  $\beta_2m$ ,  $\beta_2$ -microglobulina; RE, retículo endoplasmático; HC, cadena pesada. Modificada a partir de (Marcilla and Lopez de Castro. 2008).

#### I.4.2 HLA-B27, artritis reactiva y bacterias artritogénicas

La ReA es una inflamación estéril del tejido sinovial que se desarrolla en respuesta a una infección extra articular del hospedador (Girschick *et al.* 2008). En su forma crónica, la prevalencia de HLA-B27 se ha estimado entre un 40% y un 80% (Khan. 2002). Concretamente, para el caso de ReA inducida



por *Chlamydia trachomatis*, existen pocos estudios donde se determine la prevalencia de B27 (Keat *et al.* 1978; Kousa. 1982; Rich *et al.* 1996), debido a que frecuentemente esta infección pasa inadvertida y de manera asintomática en el hospedador. En países occidentales, *Chlamydia trachomatis* es el patógeno más frecuentemente asociado a ReA (Zeidler *et al.* 2004), estimándose la prevalencia de B27 en aproximadamente un 70% (Leirisalo *et al.* 1982). Adicionalmente, no existe un ensayo diagnóstico estándar suficientemente específico, sensible y accesible a los servicios de reumatología. Para entender los mecanismos de interacción entre el huésped y el hospedador, es crucial descifrar el perfil de citoquinas implicado en la patofisiología de la ReA. No obstante, existen datos contradictorios al respecto (Braun and Sieper. 1999; Anttonen *et al.* 2006).

El factor patogénico determinante en la ReA asociada a HLA-B27, es la infección por diversos géneros de patógenos intracelulares denominados bacterias artríticas (Figura 7), las cuales infectan al hospedador a través de las mucosas, ya sea por vía genitourinaria (*Chlamydia trachomatis*), o gastrointestinal (*Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, y menos frecuentemente *Campylobacter* y *Clostridium difficile*) (Burmester *et al.* 1995; Colmegna *et al.* 2004; Rihl *et al.* 2006). Todas son bacterias gram-negativas intracelulares obligadas o facultativas que poseen una membrana exterior compuesta por lipopolisacáridos (LPS). La asociación patológica con la articulación es similar en todos los casos. Estas bacterias poseen mecanismos de evasión que les permiten escapar del Sistema Inmune y diseminarse por el hospedador (Colmegna *et al.* 2004).

Género	Especie	Interacción con el hospedador
<i>Chlamydia</i>	<i>trachomatis</i> <i>pneumoniae</i>	Intracelular Obligado
<i>Salmonella</i>	<i>typhimurium</i>	Intracelular Facultativo
<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i> <i>pseudotuberculosis</i>	
<i>Shigella</i>	<i>flexneri</i> <i>dysenteriae</i>	

**Figura 7. Bacterias artríticas.** Principales géneros y especies de las bacterias asociadas a ReA. *Chlamydia* se comporta como un parásito intracelular obligado, mientras que el resto de los géneros son intracelulares facultativos.

Las ratas transgénicas que expresan HLA-B27 crecidas en un ambiente libre de gérmenes no desarrollan algunos de los principales síntomas de la enfermedad, tales como colitis y artritis, pero los síntomas reaparecen si se crecen los roedores en un ambiente no estéril (Taurog *et al.* 1994; Taurog *et al.* 1999), subrayando el papel de las enterobacterias en la patogenia de la enfermedad (Inman. 2006).

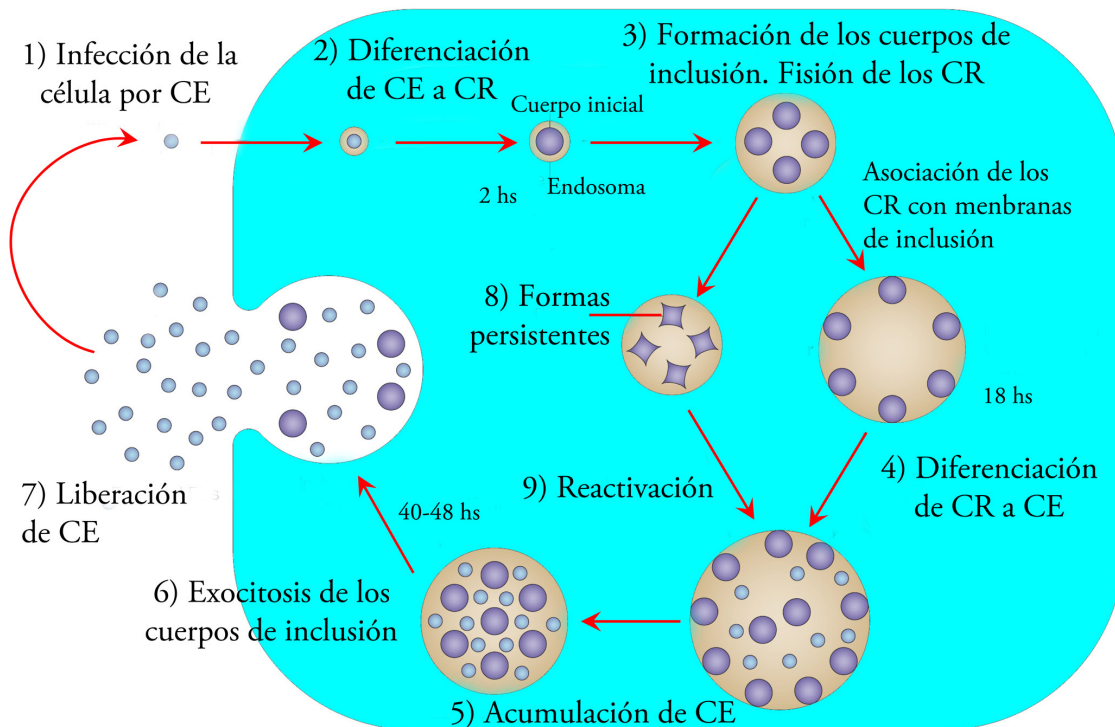
En un análisis del grado de oligoclonalidad del TCR en las células T de pacientes con ReA, se observó un cierto grado de conservación en las regiones determinantes de complementariedad CDR3 de la cadena  $\beta$  (Duchmann *et al.* 1996; Dulphy *et al.* 1999), que se mantenía incluso en estudios multicéntricos con pacientes no relacionados (May *et al.* 2002). Un mayor grado de oligoclonalidad del TCR indica una reactividad con un número reducido de antígenos, en cambio, una mayor policlonalidad indica una reactividad poco específica. Estos resultados sugieren la existencia de un número reducido de antígenos inmunodominantes en pacientes con ReA, cuya identificación aportaría probablemente una clave importante en la relación patogénica entre bacterias y ReA.

## I.5 *Chlamydia* y hospedador

*Chlamydia trachomatis* no sólo existe en su forma metabólicamente activa, sino también como forma persistente, caracterizada por un metabolismo modificado, una morfología alterada, y un estado de latencia. Este hecho explica porque estas bacterias no se pueden cultivar a partir de muestras de tejido sinovial (Hogan *et al.* 2004; Rihl *et al.* 2006).

*Chlamydia trachomatis* posee un ciclo de desarrollo bifásico (**Figura 8**) (Hackstadt *et al.* 1997). Las células epiteliales de la mucosa endocitan cuerpos elementales (CE) infecciosos, los cuales son metabólicamente inactivos. Tras la internalización de los CE por la célula hospedadora, se forma una inclusión o vacuola especializada, donde se crea un nicho endosomal propicio para la replicación bacteriana (Fields and Hackstadt. 2002; Fields *et al.* 2002). Dentro de la inclusión, los CE se transforman en formas metabólicamente activas: los cuerpos reticulares (CR), que se dividen por fisión binaria. Los CR pueden retransformarse a CE, que se liberan al medio extracelular para infectar, eventualmente, una célula epitelial vecina. En presencia de INF- $\gamma$  se inhibe el crecimiento bacteriano, a través de un mecanismo de privación de triptófano por inducción de la indol-amino deshidrogenasa (Beatty *et al.* 1994b; Beatty *et al.* 1994a; Beatty *et al.* 1994c). En consecuencia, se induce una transformación de las formas intracelulares de *Chlamydia trachomatis* hacia formas persistentes no replicativas. Cuando se suprime el inhibidor, las formas persistentes se diferencian nuevamente a formas infecciosas (Abdelrahman and Belland. 2005). *Chlamydia trachomatis* está presente en las articulaciones y en el tejido circundante de pacientes con ReA (Sigal. 2001; Colmegna *et al.* 2004) y también se ha detectado en células de sangre periférica (Kuipers *et al.* 1998), pero no en suero. Después de la infección primaria, los monocitos y/o las células dendríticas podrían diseminar el patógeno a las articulaciones (Nanagara *et al.* 1995; Granfors. 1998; Granfors *et al.* 1998). Cabe señalar la importancia de las formas

persistentes de *Chlamydia trachomatis*, las cuales contribuyen significativamente a la cronicidad de la enfermedad (Beatty *et al.* 1994d; Brunham and Rey-Ladino. 2005; Swanborg *et al.* 2006).



**Figura 8. Ciclo de desarrollo de *Chlamydia*.** *Chlamydia trachomatis* es un patógeno intracelular obligado que reside en una vacuola especializada y posee un ciclo de desarrollo bifásico. 1.- Las formas infecciosas metabólicamente inactivas o cuerpos elementales (CE) infectan las células de la mucosa. 2.- Después de ser endocitados, los CE se transforman en cuerpos reticulares (CR) y se forma una inclusión. 3.- Dentro de la inclusión, se produce la replicación. Los CE se transforman en formas metabólicamente activas o CR por fisión binaria. 4.- Los CR se transforman en CE. 5.- Los CE se acumulan y 6.- 7.- se liberan para infectar otras células. 8.- En presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano, por ejemplo  $\text{INF-}\gamma$ , *Chlamydia* adquiere su forma persistente no replicativa, 9.- la cual puede reactivarse generando formas infecciosas. CE, cuerpo elemental. CR, cuerpo reticular. Modificado a partir de (Brunham and Rey-Ladino. 2005).

Frecuentemente, las infecciones con *Chlamydia trachomatis* requieren largos períodos de tiempo para resolverse. La causa de este hecho no está clara, pero podría estar relacionada con los diferentes mecanismos de evasión que posee la bacteria para escapar del Sistema Inmune, incluyendo la producción de formas persistentes (Byrne and Ojcius. 2004; Brunham and Rey-Ladino. 2005; Roan and Starnbach. 2008). En modelos animales, la resolución de la infección depende significativamente de alcanzar un umbral crítico de reclutamiento de células T efectoras (Igietseme and Rank. 1991), sugiriendo que las células T tienen una función esencial en la resolución de la infección (Beatty and Stephens. 1994; Brunham and Rey-Ladino. 2005; Roan and Starnbach. 2008). Se han descrito tanto respuestas celulares CD4 como respuestas CD8 frente a *Chlamydia trachomatis* (Loomis and Starnbach. 2002). Además, se han encontrado CTLs específicos contra B27 en pacientes con ReA inducida por esta bacteria (Kuon *et al.* 2001; Appel *et al.* 2004). Sin embargo, la reducida efectividad de la respuesta inmune celular en la resolución de la infección, se debe en parte a los mecanismos bacterianos de evasión del Sistema Inmune

después de la infección. Particularmente, se generan formas persistentes inducidas por INF- $\gamma$ , una citoquina secretada por las propias células T activadas en la respuesta antibacteriana.

Los principales mecanismos de evasión del Sistema Inmune de *Chlamydia trachomatis* comprenden: 1) la replicación dentro de una vacuola especializada, la cual limita la exposición a los anticuerpos y a la maquinaria de procesamiento endógena (Fields and Hackstadt. 2002), 2) la modulación dual de la apoptosis, puesto que *Chlamydia* puede actuar inhibiendo o induciendo la apoptosis de la célula hospedadora. Los mecanismos antiapoptóticos inhiben la liberación del citocromo C de mitocondria, mientras que los mecanismos proapoptóticos se producen por la acción del gen CT610, probablemente vía FAS (Fan *et al.* 1998; Belland *et al.* 2001; Jendro *et al.* 2002; Stenner-Liewen *et al.* 2002a; Jendro *et al.* 2004; Schwarzenbacher *et al.* 2004c), 3) la secreción de una proteasa citosólica, identificada como factor de *Chlamydia* con actividad tipo proteasa (*chlamydial pretease-like activity factor*: CPAF), que degrada específicamente los factores de transcripción del MHC. En consecuencia, se inhibe la expresión de las moléculas de MHC de Clase I y II en la superficie celular, tanto a nivel constitutivo como inducido por INF- $\gamma$  (Zhong *et al.* 1999; Zhong *et al.* 2000; Zhong *et al.* 2001), 4) como ya hemos comentado, mediante la liberación de INF- $\gamma$  la respuesta adaptativa del hospedador puede tener un efecto vital en la inducción de formas persistentes de la bacteria. Esta habilidad le confiere a *Chlamydia* uno de sus principales mecanismos de evasión del Sistema Inmune (Beatty *et al.* 1993; Hogan *et al.* 2004), y contribuye significativamente a la cronicidad de la enfermedad (Brunham and Rey-Ladino. 2005; Swanborg *et al.* 2006).

Durante su ciclo de desarrollo, *Chlamydia trachomatis* está confinada en una inclusión intracelular (Roan and Starnbach. 2008). La bacteria utiliza un sistema de secreción de tipo III para inyectar proteínas en el citosol de la célula hospedadora (Peters *et al.* 2007). Se han descrito varias proteínas que tienen acceso al citosol (Kleba and Stephens. 2008), incluidas proteínas secretadas (Zhong *et al.* 2001; Clifton *et al.* 2004), y proteínas de la membrana de la inclusión (Bannantine *et al.* 2000). Algunas de éstas proteínas estimulan respuestas de células T CD8<sup>+</sup> en ratones (Fling *et al.* 2001; Starnbach *et al.* 2003). No obstante, una fuente más importante de antígeno puede venir dada por la fagocitosis de cuerpos apoptóticos y restos de células infectadas (Ramos and Lopez de Castro. 2002). Las células dendríticas son especialmente eficaces en estos procesos, incluyendo la *cross*-presentación (Lin *et al.* 2008a), la cual podría aportar péptidos antigénicos reconocidos por las células T CD8<sup>+</sup>.

## I.6 Mimetismo molecular y autoinmunidad

El repertorio de las células T, que incluye aproximadamente 25 millones de clonotipos potenciales (Arstila *et al.* 1999), y una gran plasticidad de reconocimiento del TCR (Ohashi. 1996; Kersh and Allen. 1996b; Kersh and Allen. 1996a), confieren protección contra una gran multitud de patógenos. La capacidad de reconocer un universo relativamente grande de epítomos no propios implica un riesgo inherente: el potencial de responder contra péptidos propios. Mediante la selección positiva y negativa en el timo, se escogen células T capaces de reconocer antígenos no propios en el contexto de moléculas de MHC propias, eliminándose aquellas que reconocen péptidos derivados de proteínas propias (Owen and Jenkinson. 1992; Hugo *et al.* 1993; Owen *et al.* 2000). Los mecanismos de tolerancia periférica controlan las células autorreactivas que hayan podido escapar a la selección tímica, manteniendo de esta forma la homeostasis (Walker and Abbas. 2002). Aún cuando los mecanismos de tolerancia central son altamente efectivos se han descrito, en individuos sanos, células T autorreactivas (Lohmann *et al.* 1996; Semana *et al.* 1999). Algunas de éstas, podrían ser específicas contra antígenos de patógenos, por consiguiente, si estos componentes fuesen eliminados se perderían especificidades potenciales. El costo de tener algunas células T autorreactivas, reguladas en la periferia para preservar la tolerancia, se amortiza por el beneficio de disponer de un repertorio más diverso (Murphy *et al.* 2008).

El mimetismo molecular (Damian. 1964) es uno de los mecanismos propuestos para explicar por qué los patógenos pueden inducir autoinmunidad en individuos genéticamente susceptibles (Albert and Inman. 1999). Si bien el mimetismo molecular entre antígenos no propios y antígenos del hospedador puede explicar el evento inicial de inducción de la respuesta autorreactiva, se necesitarían otros estímulos coadyuvantes, tales como, la inflamación producida por la infección y la intervención de otras señales coestimuladoras, para romper la tolerancia (Albert and Inman. 1999; Rose and Mackay. 2000; Ohashi and DeFranco. 2002; Ohashi. 2002). La demostración de que determinantes antigénicos de un patógeno, con una alta homología a determinantes presentes en el hospedador pueden activar CTLs, constituye una prueba concluyente en la generación de autoinmunidad a través de mimetismo molecular (Lawson. 2000; Farris *et al.* 2000; Benoist and Mathis. 2001; Walker and Abbas. 2002). Existen al menos dos desórdenes donde se ha demostrado que el mimetismo molecular es el determinante más probable de la enfermedad autoinmune. En la enfermedad reumática cardíaca, péptidos derivados de tejidos cardíacos y péptidos derivados de la proteína M del género *Streptococcus* son reconocidos por CTLs de pacientes (Guilherme *et al.* 1995). Por otra parte, en el síndrome de Guillain-Barré, se ha demostrado mimetismo molecular humoral en pacientes entre el gangliósido GM1 y los LPS de *Campylobacter* (Yuki. 2000; Ang *et al.* 2004). Otras asociaciones se han descrito entre patógenos y

autoinmunidad, señalándose al mimetismo molecular como la causa de la enfermedad: virus Coxsackie y miocarditis, *Tripanosoma cruzi* y enfermedad de Chagas, *Borrelia* y artritis de Lyme, varios tipos de virus y diabetes tipo I, Herpes virus y miastenia gravis, varios tipos de virus y esclerosis múltiple, por nombrar los ejemplos más estudiados (Benoist and Mathis. 2001; Blank *et al.* 2007).

El mimetismo molecular es un concepto que se redefine constantemente, a medida que se avanza en el conocimiento de las interacciones entre los complejos MHC-péptido y el TCR (Oldstone. 2005). El mimetismo molecular puede generarse en péptidos que poseen una alta homología de secuencia, pero también se puede generar entre péptidos sin homología obvia (Evavold *et al.* 1995; Wucherpfennig and Strominger. 1995; Hemmer *et al.* 1998; Appel *et al.* 2000; Wucherpfennig. 2005; Blank *et al.* 2007). Para estudiar el posible mimetismo molecular entre los péptidos de HLA-B27 analizados en la presente tesis, se analizó exclusivamente la homología en las secuencias peptídicas.

### I.7.1 HLA-B27, *Chlamydia trachomatis* y autoinmunidad

El mecanismo patogénico subyacente a la inducción de ReA por *Chlamydia trachomatis* supone una relación directa entre la bacteria y HLA-B27 (Zeidler *et al.* 2004), que no parece estar relacionada con la capacidad del patógeno de infectar o replicar en células HLA-B27 positivas (Young *et al.* 2001; Zeidler *et al.* 2004). El mimetismo molecular entre péptidos propios y bacterianos podría constituir dicho mecanismo patogénico (Bachmaier and Penninger. 2005). La dificultad en establecer una relación causal entre mimetismo molecular y autoinmunidad ha hecho surgir dudas sobre la relevancia de este mecanismo (Fourneau *et al.* 2004). Sin embargo, en un modelo animal, se demostró que el mimetismo antigénico entre péptidos de *Chlamydia trachomatis* derivados de la proteína CRP (60 KDa-cysteine-rich outer membrane protein) y péptidos homólogos derivados de la  $\alpha$ -miosina, inducen miocarditis autoinmune en ratón (Bachmaier *et al.* 1999). Más aún, en ratas expuestas a *Chlamydia trachomatis*, se produce una pérdida de la tolerancia a HLA-B\*2705 (Popov *et al.* 2002). Estos hechos indican la existencia de una interrelación entre HLA-B27, *Chlamydia trachomatis*, pérdida de la tolerancia y generación de autoinmunidad.

### I.7.2 HLA-B27 y mimetismo molecular

Sorrentino *et al.* describieron en HLA-B27 un elegante ejemplo de mimetismo molecular dependiente de subtipo, entre un péptido derivado de un patógeno y un ligando propio (Fiorillo *et al.* 2000). Concretamente, el péptido LMP2 (236-244) derivado de la proteína de membrana 2 del virus Epstein-Barr, correspondiente a la secuencia RRRWRRLTV, posee una alta homología con el péptido VIPR1(400-408), derivado del receptor 1 del péptido intestinal vasoactivo, y cuya secuencia es

RRKWRRWHL. En ensayos de estabilización de epítipo, el péptido endógeno VIPR1(400-408) se une mejor al subtipo no asociado a EA, B\*2709, que al subtipo asociado, B\*2705. En el contexto de los dos subtipos analizados, se demostró una reacción cruzada en células T CD8<sup>+</sup>, entre ambos péptidos. Sin embargo, sólo se detectó autorreactividad de células CD8<sup>+</sup> contra el epítipo viral presentado por el subtipo B\*2705, y especialmente en pacientes con EA (Fiorillo *et al.* 2000). Mediante técnicas cristalográficas se analizaron las conformaciones de ambos péptidos. Las dos estructuras mostraron un mayor grado de similitud en complejo con B\*2705 que en complejo con B\*2709, explicando así la reacción cruzada observada (Fiorillo *et al.* 2005). En consecuencia, este estudio demuestra la existencia de una reacción cruzada entre un epítipo viral y un péptido endógeno presentados por HLA-B27, la cual es dependiente de subtipo.

La hipótesis del péptido artrítogénico (Benjamin and Parham. 1990) ha estimulado la búsqueda de homología de péptidos bacterianos con ligandos humanos. En este sentido, Scofield *et al.* advirtieron que a diferencia de otras moléculas de MHC de Clase I, la molécula de HLA-B27 probablemente podría incluir en su estructura primaria, regiones particularmente homólogas a secuencias peptídicas provenientes de bacterias gram negativas (Scofield *et al.* 1993). Posteriormente, se describió una secuencia candidata correspondiente a los residuos 168-176 de la HC de HLA-B27, la cual poseía homología con secuencias de proteínas bacterianas (Scofield *et al.* 1995). Además, se demostró un reconocimiento específico de este péptido por CTLs de pacientes con EA, cuando este péptido fue agregado de manera exógena en ensayos de sensibilización de diana (Frauendorf *et al.* 2003). La presencia de este péptido, u otros relacionados, como ligandos de HLA-B27 se analizó por técnicas de inmunoproteómica. Aunque no se encontró el péptido B27(168-176), se identificaron los péptidos relacionados en el repertorio peptídico de HLA-B27: B27(168-179) y B27(168-171). Sin embargo, la presentación de ambos péptidos por subtipos de HLA-B27 no se correlaciona con la asociación de éstos a EA (Alvarez *et al.* 2001b).

## **I.8 Bases y estrategia experimental de esta tesis**

### **I.8.1 Antecedentes**

Para analizar el papel del mimetismo molecular en la ReA asociada a HLA-B27 inducida por *Chlamydia trachomatis*, se han seguido dos líneas de investigación basadas en dos estudios previos (Kuon *et al.* 2001; Ramos *et al.* 2002a).

Primero, en un estudio realizado en el laboratorio, Ramos *et al.* identificaron un ligando natural de HLA-B27, derivado del procesamiento del segmento intracitoplasmático de HLA-B27, que se presenta

en tres subtipos asociados a EA (B\*2702, B\*2704 y B\*2705) y no se presenta en subtipos no asociados a esta enfermedad (B\*2706 y B\*2709). Este péptido (RRKSSGGKGGSY) cuya secuencia proviene de los residuos 309-320 de HLA-B27, posee una alta homología con una secuencia de la **DNA primasa** (CT794) de *Chlamydia trachomatis* (RRFKEGGRGGKY), residuos 211-222. Asimismo, el péptido bacteriano **P(211-222)** se genera en digestiones con proteasoma 20S *in vitro* a partir de un precursor sintético y se une *in vitro* con igual eficiencia a HLA-B27 que el ligando propio **B27(309-320)** (Ramos *et al.* 2002a). Este trabajo fue el primero en estudiar el mimetismo molecular entre ligandos de HLA-B27 derivados de proteínas humanas, y secuencias de proteínas de *Chlamydia trachomatis*. No obstante, se consideró crítico determinar si el péptido bacteriano de la **DNA primasa**, o péptidos relacionados a él, son realmente procesados de manera endógena y se presentan por HLA-B27 *in vivo*.

Segundo, actualmente se desconocen las características de los péptidos de *Chlamydia trachomatis* procesados y presentados *in vivo* por HLA-B27 en células humanas. Por tanto, se utilizaron algoritmos predictivos para buscar en el proteoma de *Chlamydia trachomatis* secuencias de nueve aminoácidos que cumplieran los dos requisitos de los ligandos de MHC de clase I: una alta probabilidad de ser generados por el proteasoma, y que contengan los motivos de unión compatibles con HLA-B\*2705. Así, en ensayos de sensibilización de diana, se identificó una serie de péptidos bacterianos capaces de ser reconocidos *in vitro* por CTLs de pacientes con ReA (Kuon *et al.* 2001). Utilizando tetrámeros de HLA-B27, se demostró reacción de CTLs frente a estos péptidos en líquido sinovial (Appel *et al.* 2004). No obstante, dado el potencial de las CTLs de reaccionar cruzadamente (Wucherpfennig and Strominger. 1995; Evavold *et al.* 1995) se desconoce qué relación hay entre estos péptidos y los epítomos de *Chlamydia trachomatis* procesados naturalmente y responsables de la respuesta inmune *in vivo*. En consecuencia, al igual que en el estudio anterior relativo a la **DNA primasa** bacteriana, se consideró imprescindible evaluar si estos péptidos son generados *in vivo* por la ruta de presentación endógena de MHC de Clase I y se presentan por HLA-B27.

### I.8.2 Estrategia experimental

Idealmente, la identificación de los péptidos de *Chlamydia trachomatis* procesados endógenamente y presentados *in vivo* por HLA-B27 debería efectuarse directamente en células infectadas. Sin embargo, en la práctica una aproximación bioquímica directa sobre células infectadas es difícilmente plausible. Primero, el análisis directo de los péptidos presentados por HLA-B27 en células infectadas puede ser muy dificultoso, debido a la expresión extremadamente baja de antígenos bacterianos reportados en estas células, al menos en *Salmonella* (Ramos *et al.* 2001; Ringrose *et al.* 2004). Este hecho es determinante,



ya que desafía los límites de detección incluso de las técnicas más sensibles disponibles actualmente. Hasta la fecha, se ha descrito en células de ratón infectadas con *Chlamydia muridarum*, un solo ligando de MHC de Clase I, utilizando técnicas de espectrometría de masas (MS) de última generación (Karunakaran *et al.* 2008). Debido en parte a estas limitaciones, se han utilizado, en ratón, aproximaciones alternativas, tales como la tecnología de tetrámeros HLA o mapeo de epítomos mediante péptidos sintéticos (Fling *et al.* 2001; Starnbach *et al.* 2003; Grotenbreg *et al.* 2008), que no demuestran el procesamiento endógeno de dichos epítomos. Segundo, manipular células humanas infectadas con *Chlamydia trachomatis*, requiere trabajar bajo condiciones propicias de bioseguridad para esta bacteria. Puesto que los experimentos de inmunoproteómica necesitan grandes cantidades de células infectadas, esto supone contar con un laboratorio P3 bacteriano equipado para manipular células humanas infectadas con *Chlamydia trachomatis* en cultivos a gran escala, requisitos generalmente no disponibles. Tercero, *Chlamydia trachomatis* induce rápidamente la desaparición de la superficie de la célula infectada de las moléculas de MHC de Clase I (Zhong *et al.* 2000; Zhong *et al.* 2001). En consecuencia, se desarrolló una estrategia alternativa para abordar la cuestión de cómo péptidos derivados de proteínas bacterianas de *Chlamydia trachomatis*, pueden ser procesados de manera endógena y generar ligandos presentados por HLA-B27 *in vivo*. Este método se basa en la expresión de proteínas de fusión bacterianas con *GFP* en células humanas HLA-B27 positivas, seguida de la comparación, mediante MS, del repertorio peptídico de HLA-B27 de células transfectadas o no, con la proteína bacteriana. Esta técnica nos permitió estudiar e identificar péptidos bacterianos procesados y presentados *in vivo* por HLA-B27.

El mecanismo patogénico que vincula la infección por *Chlamydia trachomatis*, la presencia de HLA-B27, y el progreso hacia ReA constituye un problema de importancia fundamental, no sólo en la patogenia de las artritis asociadas a HLA-B27 sino de modo más general, en nuestra comprensión de los mecanismos de autoinmunidad. Para dilucidar el mecanismo de la enfermedad, es fundamental definir los ligandos y/o epítomos relevantes de *Chlamydia trachomatis* presentados por HLA-B27. Con este fin, se analizaron tres proteínas parentales de esta bacteria (Kuon *et al.* 2001; Ramos *et al.* 2002a). Primero, la **DNA primasa** (CT794). En segundo lugar, nos centramos en el análisis de la proteína NADH-quinona reductasa transportadora de Na<sup>+</sup>, subunidad A: **NQRA** (CT634), y de la proteína tipo pirroloquinolina-quinona sintasa: **PqqC** (CT610).



*Objetivos*



## Objetivos

**Objetivo general.-** Estudiar el procesamiento endógeno y presentación *in vivo* por HLA-B27 de péptidos de *Chlamydia trachomatis* con posible significación en la patogenia de la ReA.

**Objetivo 1.-** Diseñar un sistema experimental para analizar cómo péptidos de proteínas bacterianas de interés pueden ser procesados y presentados *in vivo* por HLA-B27 en células humanas.

**Objetivo 2.-** Analizar el procesamiento y presentación endógenos de secuencias de proteínas de *Chlamydia trachomatis* que poseen una alta homología con péptidos propios del repertorio constitutivo de HLA-B27: estudio de la **DNA Primasa** (CT794).

**Objetivo 3.-** Estudiar el procesamiento y presentación endógenos de secuencias que, como péptidos sintéticos, pueden unirse a HLA-B27 y ser reconocidos *in vitro* por CTLs de pacientes con ReA inducida por *Chlamydia trachomatis*: estudio de la **NQRA**, NADH-quinona reductasa transportadora de Na<sup>+</sup>, subunidad A (CT634), y de la **PqqC**, proteína tipo pirroloquinolina-quinona sintasa (CT610).



# *Materialles y Métodos*

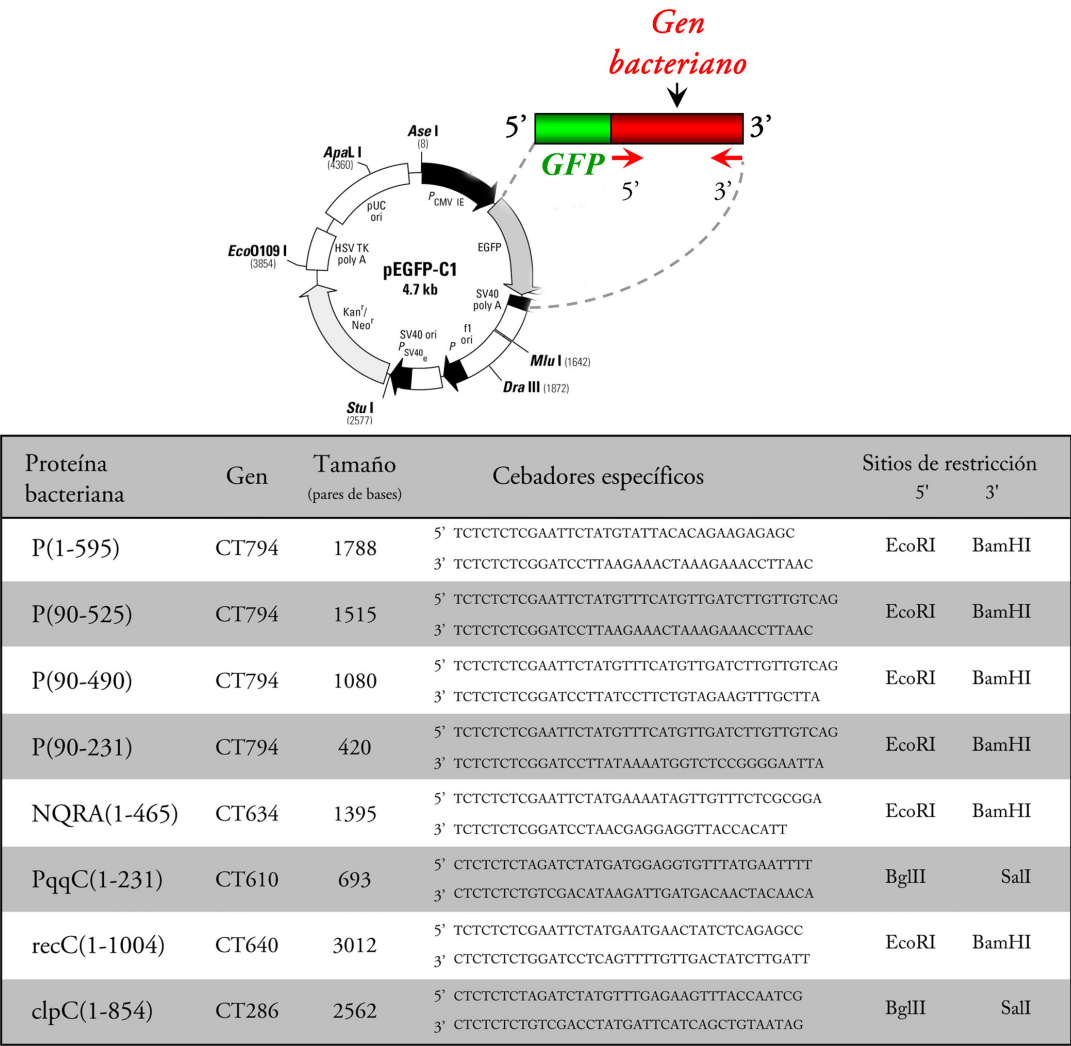




# Materiales y Métodos

## M.1.1 Construcciones génicas

Para asegurar la traducción eficiente y monitorizar la expresión de las proteínas de *Chlamydia trachomatis* se generaron proteínas de fusión donde la *GFP* se fusionó al extremo N-terminal de la proteína bacteriana de interés. El cDNA de los genes de *Chlamydia trachomatis* serovar L2 (Advances Biotechnologies, Columbia, MD) se fusionó en fase con el extremo 3' del gen de la *GFP* (Figura 9).



**Figura 9. Proteínas bacterianas fusionadas a GFP.** En la parte superior, se muestra un esquema del vector utilizado para clonar las construcciones de *Chlamydia trachomatis*. Las proteínas bacterianas se fusionaron en el extremo N-terminal de la *GFP*. Panel inferior. Se amplificaron los genes de *Chlamydia* utilizando cebadores específicos. P, DNA primasa. NQRA, NADH-quinona reductasa transportadora de Na<sup>+</sup>, subunidad A. PqqC, proteína tipo pirroloquinolina-quinona, sintasa, PqqC. recC, Exodesoxiribonucleasa V. clpC, proteasa dependiente de ATP.

Los genes de las proteínas analizadas en la presente tesis se clonaron en el vector pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech). Las construcciones de la **DNA primasa (P)**, (gen CT794, UniProtKB/Swiss-Prot nº O84799), la **recC** (gen CT640, UniProtKB/Swiss-Prot nº O84646), y la **NQRA** (gen CT634, UniProtKB/Swiss-Prot nº O84639) se clonaron entre los sitios de restricción 5' EcoRI y 3' BamHI. La

**PqqC**, (gen CT610, UniProtKB/Swiss-Prot nº O84616) y la **clpC** (gen CT286, UniProtKB/Swiss-Prot nº O84288) se clonaron entre los sitios de restricción 5' BglII y 3' SalI. Las construcciones se amplificaron mediante PCR utilizando cebadores específicos (**Figura 9**). Se diseñaron 4 construcciones para la **DNA primasa**: 1) proteína completa, **P(1-595)**, 2) una secuencia truncada sin los codones 1-89, **P(90-595)**, 3) una secuencia truncada sin los codones 1-89 y 451-595, **P(90-450)**, y 4) una secuencia truncada sin los codones 1-89 y 232-595, **P(90-231)**. Las secuencias de las proteínas **NQRA**, **PqqC**, **recC** y **clpC** (de 465, 231, 1004 y 854 aminoácidos, respectivamente) se amplificaron y clonaron completas: **NQRA(1-465)**, **PqqC(1-231)**, **recC(1-1004)** y **clpC(1-854)**.

### M.1.2 Transfectantes transitorios y transfectantes estables

Las líneas celulares COS-7 (Jensen *et al.* 1964), (cedida por el Dr. Juan Francisco Aranda, CBMSO) y HeLa (Scherer *et al.* 1953) transfectadas con B\*2705 (generadas en el laboratorio por el Dr. Iñaki Álvarez) se utilizaron para analizar la expresión de las proteínas de fusión bacterianas en experimentos de expresión transitoria (24 horas). Las condiciones de electroporación utilizadas para las líneas celulares COS-7 y HeLa fueron las siguientes: 200 V, 900 µF y 450 Ω en un electroporador ECM 600 (BTX, San Diego, CA) y 1600 mV, 50 µF y 24 Ω en un electroporador Gene Pulser™ (BioRad, Hercules, CA), respectivamente.

La línea linfóide humana Hmy2.C1R (C1R), que posee una baja expresión de sus antígenos de Clase I endógenos HLA-B\*3503 y HLA-Cw4 (Storkus *et al.* 1987; Zemmour *et al.* 1992), transfectada de manera estable con B\*2705 (Calvo *et al.* 1990) se utilizó para generar transfectantes estables de las proteínas de *Chlamydia trachomatis*. Las construcciones génicas se cotransfectaron con el vector RSV5 (Long *et al.* 1991) modificado con el gen de resistencia a higromicina (cedido por la Dra. Dolores Jaraquemada, UAB) en una relación 20:1 mediante electroporación a 300mV y 960µF en un electroporador Gene Pulser™ (BioRad, Hercules, CA). Los transfectantes que expresaron “*GFP*” o proteínas de fusión se seleccionaron con higromicina 250 µg/ml (Invitrogen). Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (FBS) (Invitrogen), 200 mM glutamina, 25mM HEPES, estreptomycin y penicilina.

### M.1.3 Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

**W6/32:** anticuerpo monoclonal IgG2a específico contra un determinante monomórfico de HLA-A, HLA-B y HLA-C, que reconoce principalmente el heterotrímero HLA-péptido- $\beta_2m$  (Barnstable *et al.* 1978).

**A6455:** antisuero de conejo anti-*GFP* (Invitrogen).

**A11122:** anticuerpo monoclonal IgG de conejo anti-*GFP* (Invitrogen).

Ambos anticuerpos se desarrollaron contra *GFP* purificada de *Aequorea victoria*. Reconocen *GFP* en su conformación nativa, *GFP* recombinante y proteínas de fusión con *GFP*.

**Anti-IgG:** antisuero anti-IgG, conjugado a HRP (*horse-radish peroxidase*) o sefarosa (TrueBlot, eBioscience, San Diego, CA)

## M.2 Citometría de flujo

Para detectar la expresión de la *GFP*, o de las proteínas de fusión bacterianas, se analizaron los transfectantes estables mediante citometría de flujo. Se lavaron  $1 \cdot 10^6$  células dos veces en 200  $\mu$ l de PBS. Las células se centrifugaron a 1600 x g. La fluorescencia asociada a *GFP* (excitación 488nm, emisión 507nm) se midió directamente en un citómetro de flujo FACSCalibur Becton Dickinson. Los datos se adquirieron y analizaron mediante el software CellQuest™ Pro versión 4.0.2 (BD Biosciences).

## M.3 Inmunoprecipitación y Western blot

Se lisaron  $2 \cdot 10^6$  células en tampón de lisis: 0.5% Igepal CA-630 (Sigma), 50mM Tris HCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4, conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche Applied Science) durante 30 minutos a 4 °C con agitación continua. Después de centrifugar 10 minutos para eliminar el material insoluble, se prelavaron los lisados con anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a bolas de sefarosa durante 2 horas. La inmunoprecipitación se realizó durante toda la noche incubando con el anticuerpo anti-*GFP* A6455 seguida de una incubación con anti-IgG de conejo acoplado a bolas de sefarosa durante 1 hora. Los experimentos se realizaron a 4 °C con agitación continua. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con tampón de lisis, se hirvieron durante 5 minutos en tampón de carga (0.0625 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% glicerol, 4% SDS, Azul de bromofenol), se procesaron mediante SDS-PAGE (150 mA, aproximadamente 1 hora), y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad) (50 mA, durante toda la noche). La inmunodetección se realizó con los anticuerpos anti-*GFP* A6445 y anti-IgG de conejo diluidos 1:10.000 y 1:5.000, respectivamente, en tampón de bloqueo (5% leche, 0.1% Tween 20, PBS). Mediante el sistema de inmunodetección ECL (Amersham Biosciences) por quimioluminiscencia. Alternativamente, se utilizaron directamente lisados totales sin inmunoprecipitación previa.

## M.4 Microscopía de fluorescencia

Se sembraron las células sobre cubreobjetos y se cultivaron durante 24 hs, se fijaron con formaldehído al 10% durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se trataron durante 5 minutos con 10 mM Glicina para bloquear los grupos aldehídos. Finalmente se prepararon las muestras con el medio de montaje Fluoromont (Southern Biotechnology Associates). Como control de fluorescencia se transfectó el vector con *GFP* vacío. Las preparaciones se analizaron con un microscopio de fluorescencia convencional invertido Zeiss Axiovert200 o un microscopio Confocal LSM510 Meta Zeiss. Todas las imágenes obtenidas se procesaron utilizando los programas LSM 5 Image Browser y Adobe Photoshop 7.0.

## M.5 Aislamiento de péptidos unidos a HLA-B27

Se aislaron los péptidos de HLA-B27 a partir de  $1 \cdot 10^{10}$  ó  $2 \cdot 10^{10}$  de células C1R-B\*2705 para experimentos de comparación de repertorios peptídicos y de secuenciación *de novo* (Paradela *et al.* 1998), y a partir de  $6 \cdot 10^8$  células para los experimentos de marcaje isotópico (Cagnolini and Lopez de Castro. 2008). Brevemente, las células se lisaron en 1% Igepal CA-630, 20mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 0.2% NaN<sub>3</sub>, pH 7.5 en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (10 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml pepstatina, 2.5 µg/ml aprotinina, 18.5 µg/ml iodoacetamida, 1mM EDTA y 2mM PMSF, fluoruro de fenil-metil-sulfonilo) durante 2 horas a 4 °C. El lisado se sometió a centrifugación diferencial durante 10 minutos a 1000 x g. Después de la ultracentrifugación durante 1 hora a 35.000 x g, el sobrenadante se aplicó sobre una precolumna de sefarosa bloqueada con Tris y se sometió a cromatografía de inmunoafinidad en columna de sefarosa acoplada al anticuerpo W6/32. Tras lavar exhaustivamente las columnas, los inmunocomplejos de HLA-B27 se eluyeron con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% a temperatura ambiente. Para separar los péptidos de la HC de HLA-B27, la  $\beta_2m$  y el anticuerpo W6/32, se filtraron a través de un centricon 3 (Amicon, Beverly, MA). Se concentró la muestra mediante un sistema de vacío SpeedVac (Savant Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN). La mezcla peptídica se fraccionó mediante cromatografía de HPLC de fase reversa en un cromatógrafo Waters Alliance (Waters, Milford, MA) utilizando una columna Vydac C18 (0.21×25 cm) con un tamaño de poro de 5µm (Vydac, Hesperia, CA). La separación se realizó a un flujo constante de 100 µl/min empleando el siguiente gradiente: condiciones isocráticas de disolvente A (TFA 0.08% en agua) durante 10 minutos, un incremento lineal de 0 a 44% de disolvente B (acetonitrilo 80% y TFA 0.075% en agua) durante 90 minutos y un segundo incremento de 44 a 100% de disolvente B durante 35 minutos. La cromatografía fue monitorizada midiendo la absorbancia a 210 y 280 nm

simultáneamente. Se recogieron fracciones de 50 µl entre el minuto 40 y el minuto 115 del gradiente cromatográfico y se almacenaron a -20 °C para su posterior análisis.

## M.6 Espectrometría de masas

Los ligandos de HLA-B27 separados por HPLC se analizaron por MS de MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight*) (**Figura 10, panel superior**). Las fracciones de HPLC correspondientes a los experimentos de la proteína de fusión P(90-450), y sus respectivos controles, se analizaron con un instrumento MALDI-TOF Bruker Reflex IV<sup>TM</sup> (Bruker Daltoniks, Bremen, Alemania). Las fracciones de HPLC de las proteínas de fusión NQRA(465) y PqqC(1-231), y sus respectivos controles, se analizaron con un equipo MALDI-TOF-TOF Applied 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Las fracciones de HPLC se secaron con un sistema de vacío SpeedVac, se resuspendieron en tampón TA (33% acetonitrilo y 0.1% TFA en agua) y se cargaron en una placa de MALDI-TOF. Una vez secas a temperatura ambiente, se añadió la matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (Bruker Daltoniks) en tampón TA y se dejó secar igualmente, a temperatura ambiente.

Para el espectrómetro Bruker Reflex IV<sup>TM</sup>, el volumen de tampón TA utilizado tanto para resuspender las muestras y/o matriz y cargar la placa de MALDI-TOF MTP AnchorChip<sup>TM</sup> 600/384 TF (Bruker Daltoniks) fue de 0.5 µl. Para el espectrómetro de masas Applied 4800 se utilizó un volumen de tampón TA de 0.6 µl en una Placa de MALDI-TOF Opti-TOF<sup>TM</sup> 384-well MALDI insert (Applied Biosystems). La matriz se utilizó a una concentración de 2 mg/ml y 3 mg/ml, respectivamente.

En ambos casos los datos se adquirieron en modo reflector positivo. Se utilizaron para analizar los datos de MS los programas “MoverZ” (version 2001.02.2003, Genomic Solutions) y “Data Explorer” (version 4.9, Applied Biosystems). Para analizar las muestras peptídicas por MS, se utilizó 1/5 del volumen de cada fracción de HPLC.

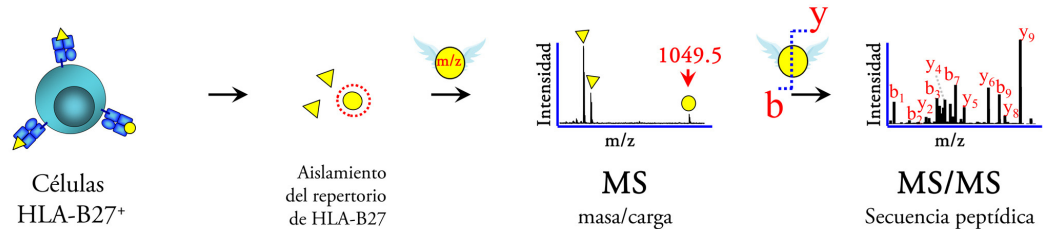
## M.7 Secuenciación de péptidos

La secuenciación peptídica se realizó por MS/MS mediante nanoelectrospray acoplado a una trampa iónica (IT) cuadrupolar en un equipo LCQ Classic o en un equipo LCQ DECA-XP (ambos de Finnigan Thermoquest, San José, CA) usando el programa Xcalibur 2.0 (Finnigan Thermoquest, San José, CA) tras una separación cromatográfica “en línea” (Merino *et al.* 2005). También se utilizó un espectrómetro de masas de MALDI-TOF-TOF Applied 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) en modo de disociación inducida por colisión. Se utilizó aire atmosférico

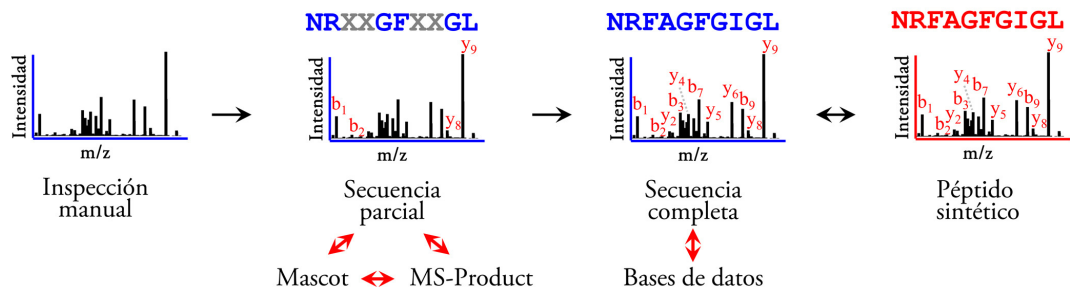
como gas de colisión y una ventana de aislamiento de iones precursores de  $\pm 2.5$  Da (Cragnolini and Lopez de Castro. 2008; Cragnolini *et al.* 2009).

La interpretación de los espectros de fragmentación se realizó manualmente pero asistida por varias herramientas informáticas (**Figura 10, panel inferior**).

#### Análisis del repertorio de HLA-B27 mediante Espectrometría de Masas



#### Secuenciación *de novo*



**Figura 10. Caracterización del repertorio peptídico de HLA-B27 mediante espectrometría de masas. Panel superior.** El análisis del repertorio peptídico de HLA-B27 se realiza mediante MS, donde los péptidos se ionizan y se detectan en un espectrómetro de masas. Básicamente, en el análisis MS, se determina la relación masa/carga ( $m/z$ ) de cada uno de los componentes peptídicos de una muestra dada. En consecuencia, el análisis MS nos provee información acerca de la masa peptídica. Los iones moleculares del análisis MS pueden ser “fragmentados” mediante MS/MS, generando fragmentos (principalmente de las series “y” y “b”), los cuales pueden ser detectados y aportar información acerca de la secuencia de aminoácidos del ión precursor (Steen and Mann. 2004). **Panel inferior.** Procedimiento para la secuenciación *de novo* de los ligandos de HLA-B27. Usualmente, la inspección manual del espectro de MS/MS nos permite inferir una secuencia parcial. La búsqueda de secuencias candidatas en las proteínas correspondientes se realizó con el programa Mascot. Para completar la asignación de iones, se utilizó la herramienta MS-Product. Adicionalmente, se verifica la secuencia peptídica en las bases de datos (EBI y/o NCBI). La asignación se confirma mediante el análisis MS/MS del péptido sintético correspondiente.

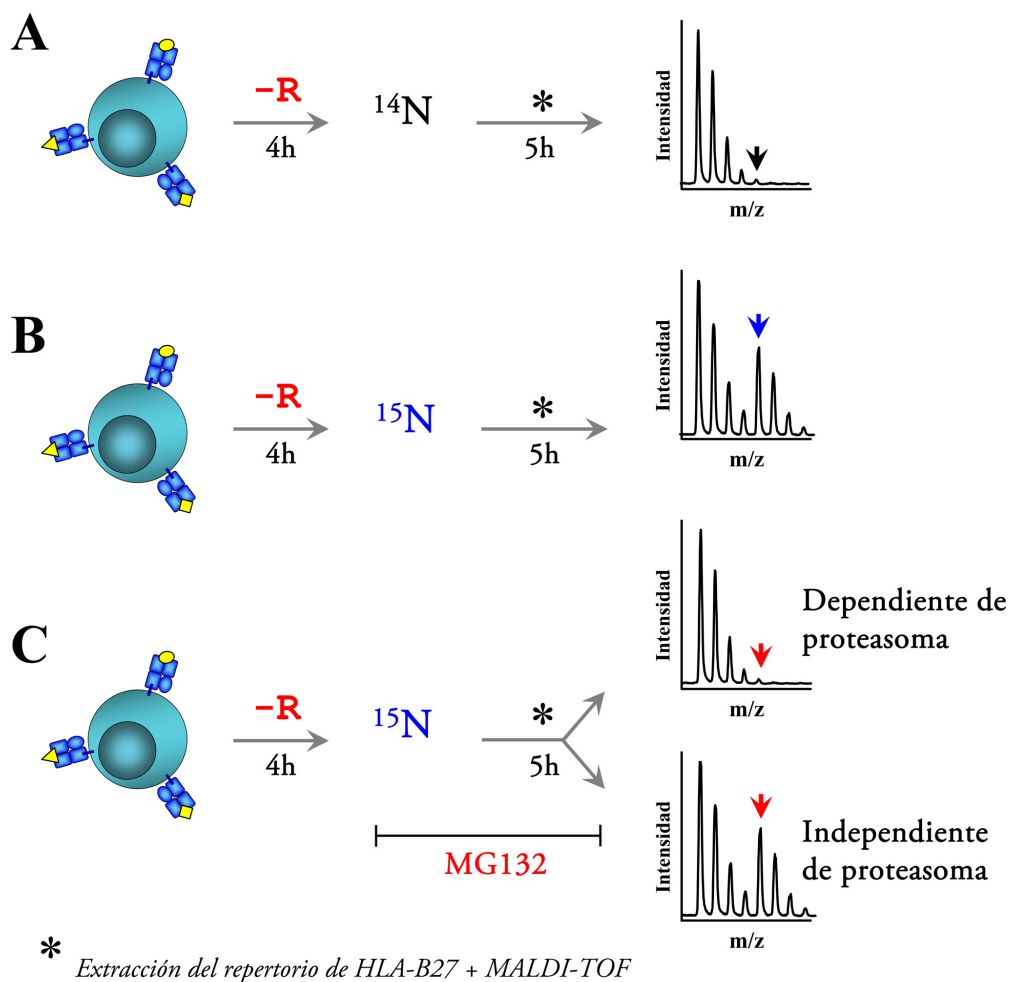
La inspección manual del espectro de MS/MS nos permitió deducir una secuencia candidata, generalmente parcial. Esta información se utilizó para buscar coincidencias con las secuencias de las proteínas bacterianas correspondientes, utilizando el programa Mascot (<http://www.matrixscience.com>, Matriz Science Inc, Boston, USA ). La herramienta informática MS-Product (<http://prospector.ucsf.edu/mshome.htm>), que genera una lista de los iones de fragmentación teóricos a partir de una secuencia dada, se utilizó para completar la asignación de los iones de las secuencias candidatas de las proteínas de *Chlamydia trachomatis* coincidiendo con nuestros datos experimentales de

MS/MS. Las secuencias peptídicas asignadas se confirmaron formalmente mediante análisis MS/MS de los correspondientes péptidos sintéticos. Los espectros de fragmentación ampliados de los ligandos y de los respectivos péptidos sintéticos pueden encontrarse en el Anexo I de esta tesis.

Los péptidos sintéticos se obtuvieron usando síntesis química N-(9-fluorenil) metoxycarbonil estándar y se purificaron por cromatografía de HPLC. Mediante MS de MALDI-TOF se verificó la masa molecular correcta de los péptidos purificados.

## M.8 Marcaje isotópico

La estrategia utilizada fue similar a la aproximación experimental descrita por Marcilla *et al.* para estudiar la dependencia de proteasoma de los ligandos de HLA-B\*2705 (Marcilla *et al.* 2007).



**Figura 11. Estrategia experimental para distinguir ligandos de B27 “dependientes” e “independientes” de proteasoma.** Tres alícuotas iguales de células C1R-B\*2705 se incuban en medio sin arginina durante 4 horas. Posteriormente se suplementa el medio con **A.**- arginina ligera, **B.**- arginina pesada o **C.**- arginina pesada y MG132. El MG132 se añade 30 minutos antes de incorporar el isótopo pesado y se mantiene durante la incubación posterior. Tras 5 horas en las nuevas condiciones, se aíslan los péptidos unidos a HLA-B27 mediante cromatografía de afinidad y extracción ácida (\*). El fraccionamiento peptídico se realiza por HPLC de fase reversa. El marcaje isotópico de los ligandos de B27 se detecta a través de espectros de MALDI-TOF de alta resolución. Se muestra un péptido que contiene 2 argininas. Modificada a partir de ((Marcilla *et al.* 2007).

Los transfectantes C1R-B\*2705 se distribuyeron en tres botellas de cultivo, aproximadamente  $6 \cdot 10^8$  células por botella, y se incubaron durante 4 horas en medio DMEM sin arginina suplementado con FBS 10% (**Figura 11**). Se utilizó medio suplementado con higromicina para cultivar los transfectantes hasta alcanzar la cantidad de células necesaria. Se suplementó cada una de las botellas con 100  $\mu\text{g/ml}$  de arginina ligera ( $^{14}\text{N}$ ), con 100  $\mu\text{g/ml}$  de arginina pesada: L-arginina guanido [ $^{15}\text{N}_2$ ] (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA), en la que dos átomos de nitrógeno del grupo guanidinio han sido sustituidos por  $^{15}\text{N}$ , o con el inhibidor reversible específico de proteasoma MG132 20  $\mu\text{M}$  (carbobenzoil-L-leucil-L-leucil-L-leucinal, Calbiochem) (Rock *et al.* 1994). El inhibidor se incorporó 30 minutos antes de la adición de 100  $\mu\text{g/ml}$  de arginina pesada y se mantuvo durante el resto del experimento. Tras 5 horas de incubación en las nuevas condiciones, las células se lavaron 2 veces con Tris 20 mM, 150 mM NaCl, 0.2%  $\text{NaN}_3$ , pH 7.5 y el sedimento se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$  para su procesamiento posterior.

## M.9 Automatización del análisis comparativo de los datos de MS de MALDI-TOF

La comparación manual de los repertorios peptídicos unidos a los distintos subtipos de HLA-B27 y HLA-B14 implica la comparación sistemática de varios miles de iones, lo cual requiere períodos de tiempo considerables (Sesma *et al.* 2002; Ramos *et al.* 2002b; Merino *et al.* 2005; Gomez *et al.* 2006). Para automatizar este proceso, basándose en la experiencia metodológica previa del laboratorio, Noel García-Medel diseñó y programó una herramienta informática para ejecutar esta tarea automáticamente (Cragnolini *et al.* 2009). Se realizó una comparación sistemática de los datos de MS de MALDI-TOF de las fracciones de HPLC de los repertorios peptídicos unidos a HLA-B\*2705 mediante un algoritmo programado en Visual Basic 6.0 e implementado como una macro en Microsoft® Excel, el cual se designó “high throughput Mass Data Manager” (htMDM). La herramienta htMDM reconoce la lista de datos numéricos de cada uno de los espectros del programa del espectrómetro de masas de MALDI-TOF-TOF (Data Explorer, version 4.9, Applied Biosystems) y utiliza los siguientes parámetros: relación carga/masa ( $m/z$ ), intensidad relativa (i.r.), y relación señal/ruido ( $s/n$ ). Para efectuar la comparación automática de los datos de MS de diferentes repertorios o *pools* peptídicos, se realizaron los siguientes ajustes. Primero, se eliminaron las señales  $m/z$  menores que una  $s/n$  definida por el usuario, relativa a la  $s/n$  promedio del espectro de MS. La  $s/n$  usada en nuestro estudio fue de 3. Segundo, debido a la heterogeneidad entre los diferentes espectros, se calculó la  $s/n$  de cada pico relativa a la  $s/n$  máxima observada en cada espectro y se excluyeron los valores menores a una  $s/n$  relativa definida. En nuestro



estudio se utilizó un valor de corte del 5%. Tercero, para efectuar la comparación de los datos de MS de los espectros de las fracciones de HPLC correlativas ( $\pm 1$ ) de dos repertorios peptídicos, se consideraron las señales m/z como idénticas cuando dichas señales estaban dentro de un rango definido por el usuario que depende de la exactitud del instrumento usado. El rango utilizado en nuestro estudio fue de  $\pm 0.4$ . Asimismo, se generó una lista de exclusión de señales m/z provenientes de la matriz, la cual se obtuvo a partir del análisis directo por MS del ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico sin ninguna muestra peptídica. Previamente a la comparación peptídica, se excluyeron automáticamente de todos los espectros de MS los picos cuyos valores m/z detectados fueron idénticos ( $\pm 0.4$ ) a los valores m/z de matriz de la lista de exclusión.

Además, la herramienta htMDM permite buscar automáticamente señales peptídicas con valores m/z específicos, por ejemplo ligandos peptídicos candidatos o péptidos de un tamaño particular. Permite también incorporar una lista de inclusión con valores m/z de interés, los cuales pueden almacenarse y usarse para resaltar de manera automática la presencia de iones con esos valores m/z. Los datos de salida (*output*) del htMDM consisten en una lista de valores m/z filtrados con el correspondiente tiempo de retención o número de fracción de HPLC. El programa resalta las coincidencias con los directorios de exclusión e inclusión, así como las señales m/z comunes y específicas de cada uno de los repertorios peptídicos comparados. Para validar las comparaciones de los repertorios peptídicos ejecutados por la herramienta htMDM, se realizaron comparaciones automáticas y manuales de forma paralela, verificándose el correcto funcionamiento de la misma.

## M.10 Búsqueda de homología en bases de datos

La búsqueda de homologías entre los péptidos de *Chlamydia* y proteínas humanas se realizó en la base de datos UniProtKB (actualización 54.0; Julio 24 de 2007) en el sitio web <http://www.expasy.org/sprot/> utilizando la aplicación Fasta 3 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta/index.html>). También se utilizó la base de datos no redundante del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/producttable.shtml#blastp>): Non-redundant GenBank CDS translations + PDB (Protein Data Bank) + SwissProt (UniProtKB) + PIR (UniProtKB) + PRF (Protein Research Foundation, Osaka) utilizando la aplicación Blast ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)).



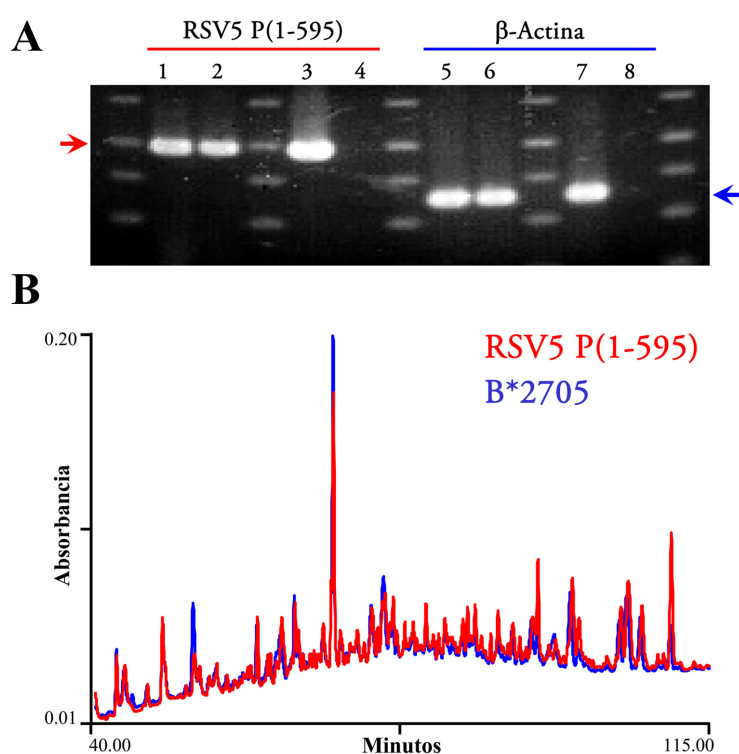
*Resultados*



## Análisis preliminares

### A.P.1 La transfección del gen de la DNA primasa de *Chlamydia trachomatis* no resultó en detección de péptidos bacterianos por HLA-B27

Se realizó una comparación de los repertorios peptídicos unidos a HLA-B27 de la línea celular C1R-B\*2705 utilizada como control, y de la misma línea celular transfectada de manera estable con el vector RSV5 clonado con la secuencia completa (aminoácidos 1-595) de la DNA primasa de *Chlamydia trachomatis*: RSV5 P(1-595). Se verificó por *RT-PCR* la transcripción del gen CT794 de la DNA primasa (**Figura 12 A**). A pesar de que la transfección del gen bacteriano generó una transcripción activa, no se obtuvo evidencia experimental de una traducción significativa. No se detectaron señales peptídicas específicas por MS en este transfectante (**Figura 12 B** y datos no mostrados). La aparente ausencia de síntesis de la proteína bacteriana podría deberse a la incompatibilidad de las secuencias de RNA bacteriano con la maquinaria de traducción eucariota.

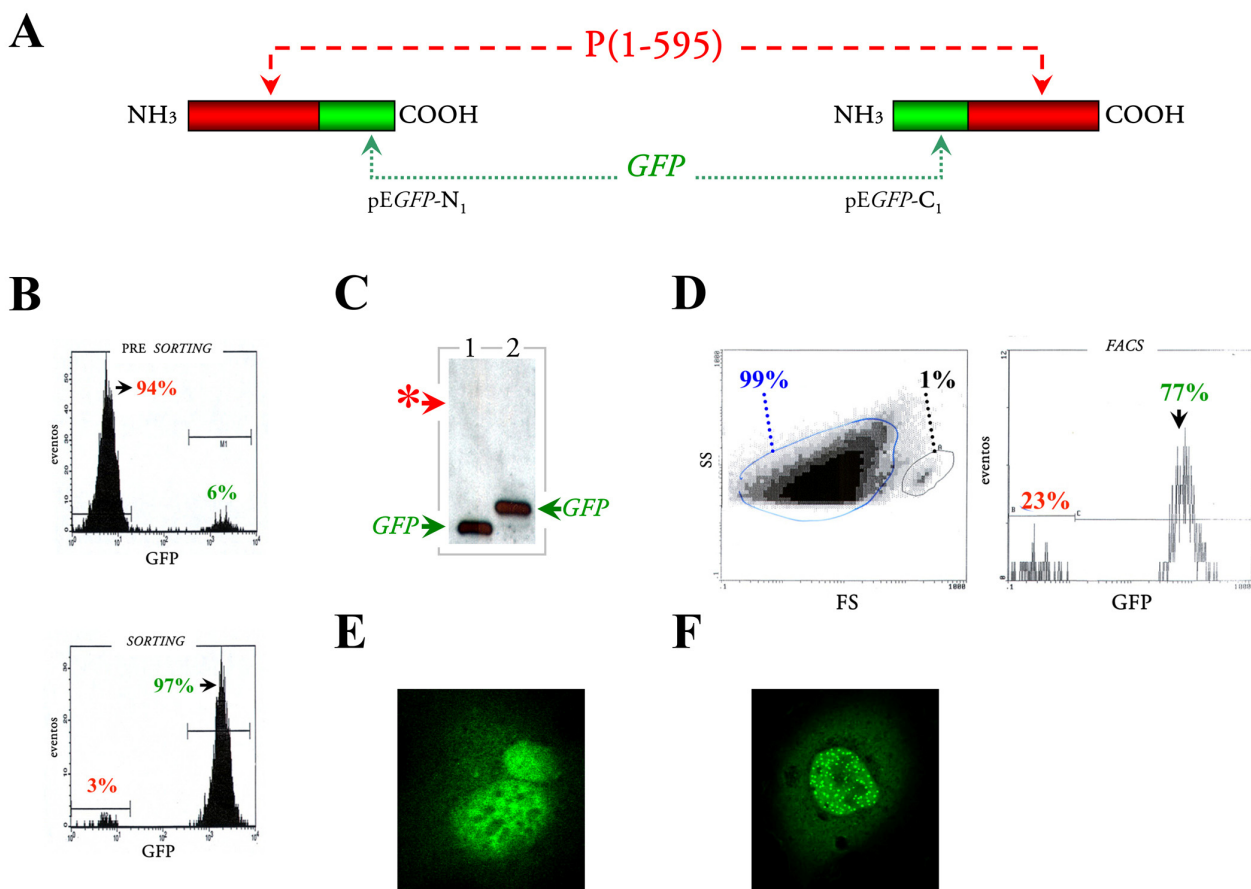


**Figura 12. Transcripción efectiva y ausencia de señales peptídicas diferenciales en el transfectante RSV5 P(1-595).** A.- RT-PCR del transfectante estable de la DNA primasa (P), RSV5 P(1-595). A la izquierda, se muestra el análisis de la transcripción gen de la DNA primasa (flecha roja), utilizando cebadores específicos internos (5' TGCTCCTGAGCAAAGATTGTT. 3'GACAAAGATCCCCAACACGTA). A la derecha, se muestra el análisis de la  $\beta$ -actina utilizada como control (flecha azul). Se utilizaron  $1 \cdot 10^6$  células por carril. Se analizaron las muestras al comienzo (1 y 5) y al final (2 y 6) del cultivo del número de células necesario para MS. Controles positivos: se utilizó cDNA molde de DNA primasa y de  $\beta$ -actina, respectivamente (3 y 7). Controles negativos: reacción sin DNA molde (4 y 8). B.- Cromatograma a 210 nm del repertorio unido a HLA-B27 del transfectante RSV5 P(1-595), en color rojo, y del control C1R-B\*2705, en azul. Mediante análisis de MS de MALDI-TOF de las fracciones de HPLC (datos no mostrados), no se detectaron señales diferenciales en el transfectante estable RSV5 P(1-595).



## A.P.2 Selección de los vectores de expresión con *GFP* fusionada en el extremo N- ó C-terminal de la proteína bacteriana

Para monitorizar la expresión de la DNA primasa bacteriana y determinar si el fallo en la traducción es debido a la inadecuación de las secuencias de iniciación procariotas en la traducción de células humanas, se optó por una estrategia alternativa empleando proteínas de fusión bacterianas con *GFP*. Se clonó la **DNA primasa** en los vectores pEGFP-N<sub>1</sub> y pEGFP-C<sub>1</sub> (Clontech). Estos plásmidos permiten generar proteínas de fusión con *GFP* en el extremo N y C-terminal de la P(1-595), respectivamente (**Figura 13 A**). Se utilizaron ambas construcciones en experimentos de expresión estable en células C1R-B\*2705.



**Figura 13. Análisis de la expresión de la DNA primasa bacteriana fusionada al extremo N ó C-terminal de la *GFP*.** A.- Esquema de las construcciones con *GFP* fusionada en el extremo C ó N-terminal de la DNA primasa: P(1-595). B.- Enriquecimiento de la población *GFP*-positiva mediante sorting celular del transfectante de la P(1-595), utilizando el vector pEGFP-N<sub>1</sub> en células C1R. C.- (1) \*No se observó el tamaño de la proteína de fusión completa en el transfectante pEGFP-N<sub>1</sub>-P(1-595), sin embargo se detectó una *GFP* “truncada”, (2) *GFP* control. D.- Para la construcción pEGFP-C<sub>1</sub>-P(1-595), no se obtuvieron transfectantes estables, aunque se observó una aparente disminución en la viabilidad celular del transfectante. E.- En ensayos de expresión transitoria en células COS7, se observó un patrón de fluorescencia nuclear y citosólico similar al obtenido con *GFP* para la construcción pEGFP-N<sub>1</sub>-P(1-595). F.- En dichos ensayos se observó un patrón nuclear localizado con la construcción en pEGFP-C<sub>1</sub>-P(1-595).

Se obtuvieron transfectantes con la construcción pEGFP-N<sub>1</sub>-P(1-595). Después de enriquecer la población GFP-positiva mediante un *sorting* celular (**Figura 13 B**), se observó por inmunoprecipitación y Western blot con anticuerpo una banda correspondiente a una GFP “truncada” (**Figura 13 C**), compatible con fenómenos proteolíticos asociados a la incompatibilidad entre la maquinaria de traducción eucariota frente a una proteína procariota y/o a un mal plegamiento de la misma. Por otra parte, no se obtuvieron transfectantes estables con la construcción pEGFP-C<sub>1</sub>-P(1-595), y se observó una disminución significativa de la viabilidad celular de estos transfectantes GFP positivos (**Figura 13 D**).

Una posible explicación de este hecho es que la DNA primasa bacteriana podría estar compitiendo con la DNA primasa humana por la unión al DNA, interfiriendo así con la replicación de DNA humano. En consecuencia, la proteína bacteriana afectaría la viabilidad celular.

En experimentos de expresión transitoria en células COS-7, se observaron los siguientes patrones de localización con las construcciones pEGFP-N<sub>1</sub>-P(1-595) y pEGFP-C<sub>1</sub>-P(1-595): en el primer caso se observó una tinción difusa nuclear y citosólica, similar al patrón de tinción de GFP (**Figura 13 E**), en el segundo, se observó una tinción nuclear localizada (**Figura 13 F**).

En base a estos resultados, en sucesivos intentos se utilizó el vector pEGFP-C<sub>1</sub> para clonar y expresar de manera estable en células humanas C1R-B\*2705 las diferentes proteínas de *Chlamydia trachomatis* utilizadas para el análisis del procesamiento y presentación de péptidos por HLA-B27.



## Resultados

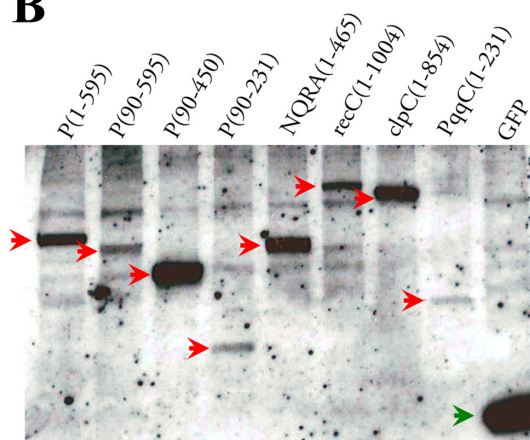
### R.1 Expresión de proteínas de fusión bacterianas en células humanas

La utilización de proteínas de fusión constituye un método de elección para monitorizar la expresión de proteínas bacterianas en células humanas. Se generaron proteínas de fusión donde la *GFP* se fusionó al extremo N-terminal de la proteína de *Chlamydia trachomatis* de interés.

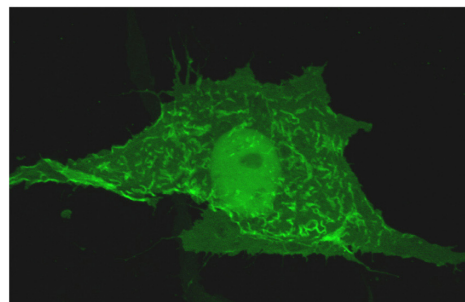
**A**

Proteína bacteriana	Gen	Tamaño (aminoácidos)	Proteína de fusión (KDa)	Swiss-Prot nº	Transflectante transitorio	Transflectante estable
P(1-595)	CT794	595	95.0	O84799	Si	No
P(90-595)	CT794	505	87.6	O84799	Si	Si
P(90-450)	CT794	360	70.2	O84799	Si	Si
P(90-231)	CT794	140	43.8	O84799	Si	No
NQRA(1-465)	CT634	465	78.7	O84639	Si	Si
PqqC(1-231)	CT610	231	53.7	O84616	Si	Si
recC(1-1004)	CT640	1004	114.4	O84646	Si	No
clpC(1-854)	CT286	854	95.1	O84288	Si	No

**B**



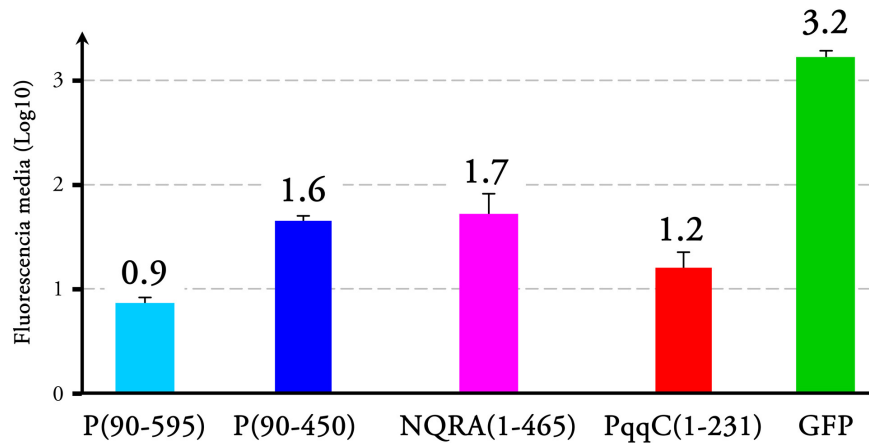
**C**



**Figura 14. Proteínas bacterianas de *Chlamydia trachomatis* analizadas.** A.- Se muestran en la tabla las proteínas de *Chlamydia trachomatis* analizadas, indicando el tamaño de la proteína de fusión con *GFP*. Peso molecular de la *GFP* = 27 KDa. B.- Expresión transitoria de proteínas de fusión bacteriana en células HeLa B\*2705. A las 24 horas se analizó mediante Western blot de lisados celulares con anticuerpo anti-*GFP*. Se indica con una flecha la banda correspondiente al peso molecular esperado de la proteína de fusión. C.- Se realizaron experimentos de expresión transitoria en células COS7. A las 24 horas se analizó la fluorescencia asociada a *GFP* mediante microscopía confocal. En la figura se muestra el patrón de fluorescencia del transflectante NQRA, el cual es consistente con un patrón de tinción mitocondrial.

En esta tesis se realizaron 8 construcciones (**Figura 14 A**): 4 construcciones de la DNA primasa o fragmentos de la misma, P(1-595), P(90-595), P(90-450), P(90-231), y 4 construcciones de las proteínas NQRA(1-465), PqqC(1-231), recC(1-1004), clpC(1-854).

Para evaluar la funcionalidad de las construcciones generadas, se realizaron experimentos de transfección transitoria en células COS-7 y HeLa B\*2705. Tras 24 horas se analizó la expresión mediante Western blot y/o microscopía confocal. Se muestran ejemplos de algunos experimentos representativos (**Figura 14 B y C**).



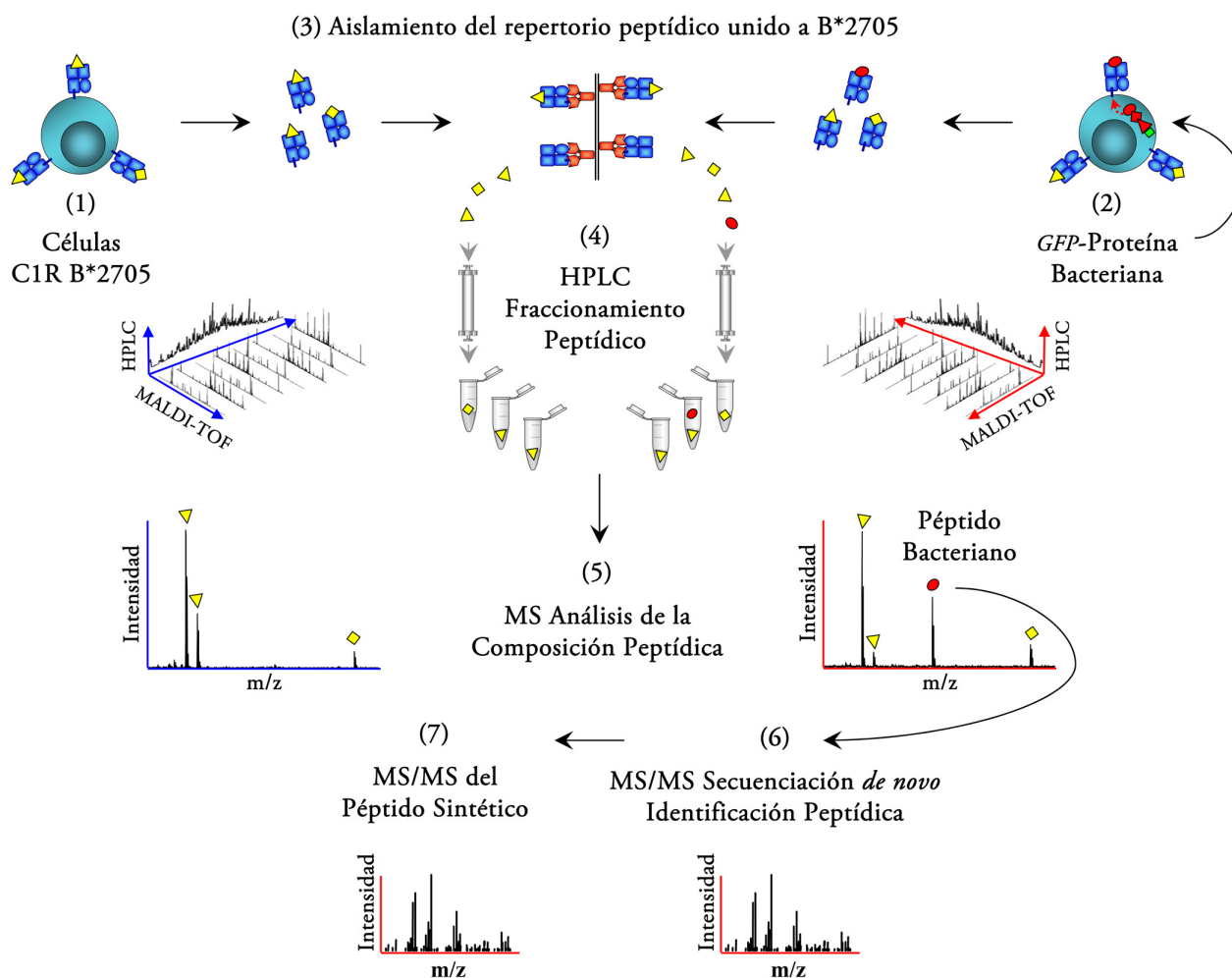
**Figura 15. Expresión estable de las proteínas bacterianas en células humanas C1R-B\*2705.** Fluorescencia de los transfectantes estables de las proteínas de fusión de *Chlamydia trachomatis*, medidas por citometría de flujo. Se muestran las medias de fluorescencia, correspondiente a tres experimentos independientes. En todos los casos, la fluorescencia de los transfectantes de las proteínas de fusión fue menor que la fluorescencia del transfectante de *GFP*, utilizado como control.

Las mismas construcciones se utilizaron para generar transfectantes estables en la línea celular C1R-B\*2705. No se obtuvieron transfectantes estables con P(1-595), P(90-231), *recC*(1-1004) o *clpC*(1-854). Para el resto de las construcciones dichos transfectantes fueron viables. El nivel de expresión de la proteína de fusión bacteriana se analizó por citometría de flujo. Los niveles observados fueron variables dependiendo de cada construcción y siempre menores que la expresión de *GFP* sola, utilizada como control (**Figura 15**).

### R.1.1 Diseño y ejecución del modelo experimental

En la presente tesis se desarrolló un sistema para abordar la cuestión de cómo secuencias relevantes de proteínas de *Chlamydia trachomatis*, pueden ser procesadas endógenamente y generar ligandos presentados por HLA-B27 *in vivo*. Este método se basa en la introducción de proteínas de fusión en células humanas HLA-B27 positivas, seguida de la comparación, mediante MS, del repertorio peptídico de HLA-B27 de células transfectadas o no, con la proteína bacteriana de interés.

El sistema experimental consiste en los siguientes pasos (**Figura 16**): 1) la línea celular humana C1R-B\*2705 se usó como recipiente para generar transfectantes estables que expresen proteínas de fusión bacterianas, 2) se generaron proteínas de fusión con *GFP* fusionada al extremo N-terminal de la



**Figura 16. Estrategia para la identificación de ligandos de HLA-B27 de *Chlamydia trachomatis* procesados endógenamente.** Se aislaron los repertorios unidos a HLA-B27 a partir de transfectantes estables C1R-B\*2705 (1), que expresan, o no, la proteína de fusión GFP-proteína bacteriana (2). Tras el aislamiento del repertorio peptídico mediante cromatografía de afinidad con el anticuerpo W6/32, se procedió a la elución en medio ácido de los péptidos unidos a B27. (4) Los *pools* peptídicos se fraccionaron por HPLC en condiciones de gradiente similares y en experimentos consecutivos. Se analizó cada fracción de HPLC por MS de MALDI-TOF. (5) Para identificar péptidos bacterianos diferenciales en los transfectantes de GFP-proteína bacteriana, se realizó una comparación sistemática de los espectros de las fracciones de HPLC correlativas. (6) Se determinó la secuencia de aminoácidos en los iones peptídicos específicos por análisis de MS/MS. (7) Por último, se sintetizó el correspondiente péptido sintético y su espectro de fragmentación se comparó con el espectro del ligando bacteriano asignado.

proteína bacteriana de interés, 3) se aislaron los repertorios peptídicos unidos a HLA-B\*2705 a partir de  $1 \text{ ó } 2 \cdot 10^{10}$  células que expresan o no la proteína bacteriana, 4) ambos repertorios peptídicos se fraccionaron por HPLC, en experimentos consecutivos e idénticas condiciones de gradiente cromatográfico para minimizar las alteraciones en los patrones de elución peptídicos, 5) para buscar los péptidos específicos provenientes de las proteínas bacterianas, se obtuvieron los espectros de MS de MALDI-TOF de cada una de las fracciones de HPLC del *pool* peptídico proveniente del transfectante bacteriano, y se comparó con la fracción correlativa (i), anterior (i-1) y posterior (i+1) del *pool* peptídico control, 6) se secuenciaron *de novo* las señales peptídicas diferenciales por MS/MS de MALDI-TOF-TOF (o en algunos casos por MS/MS ESI-IT), 7) la secuencia asignada se validó por comparación directa con el espectro MS/MS del péptido sintético. En los casos en donde el análisis comparativo

global no detectó la presencia de señales peptídicas particulares, tales como ligandos candidatos o epítomos de células T predichos, se realizó una fragmentación a ciegas en las fracciones de HPLC correspondientes al tiempo de retención esperado  $\pm 2$  minutos, utilizando una ventana de fragmentación acotada a la relación m/z del péptido diana.

## **R.2 DNA primasa: procesamiento endógeno y presentación de ligandos de HLA-B27**

En un estudio previo realizado en el laboratorio, se describió un ligando natural de HLA-B27 que posee una alta homología con una secuencia de la DNA primasa de *Chlamydia trachomatis* (Ramos *et al.* 2002a). La DNA primasa es un polipéptido de 595 aminoácidos cuya función es sintetizar los cebadores antisentido (fragmentos de Okazaki) de la hebra complementaria 3' 5', durante la replicación del DNA (Versalovic and Lupski. 1993; Bergerat *et al.* 1997).

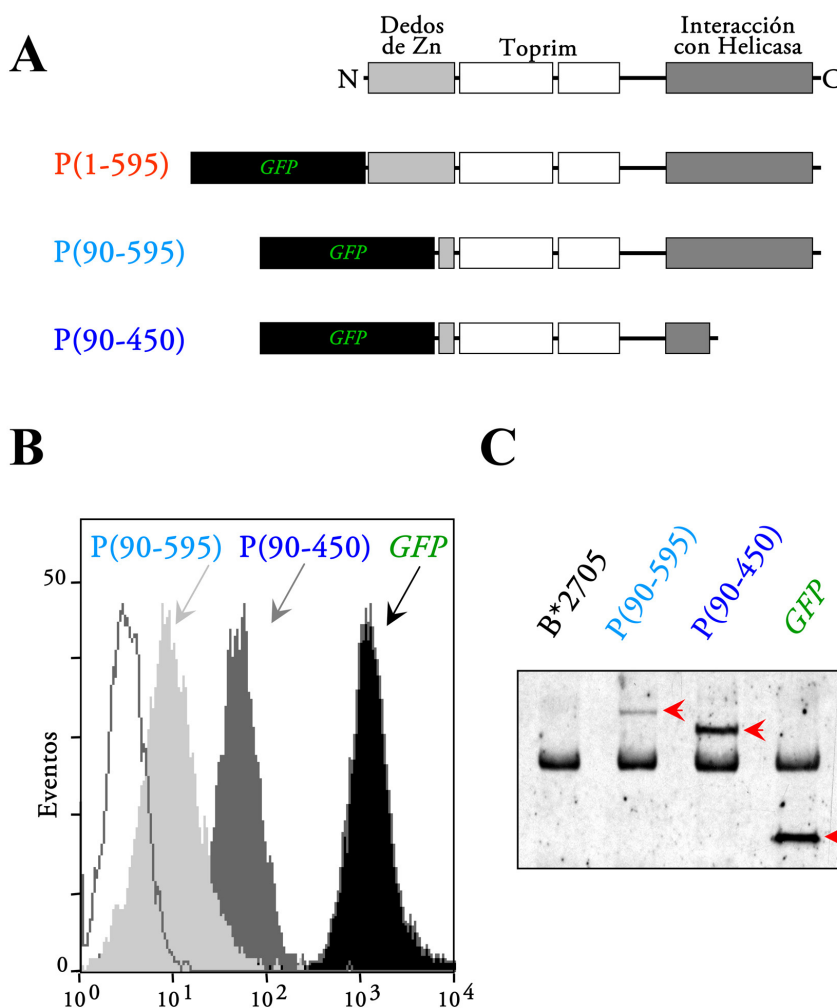
### **R.2.1 Expresión estable de la DNA primasa bacteriana en células C1R-B\*2705**

Se diseñaron cuatro construcciones con proteínas de fusión en donde la *GFP* se fusionó: 1) al extremo N-terminal de la secuencia completa de la DNA primasa, **P(1-595)**, 2) a un fragmento sin los primeros 89 residuos del extremo N-terminal, **P(90-595)**, 3) a un fragmento sin los 89 residuos del extremo N-terminal y sin los últimos 144 residuos del extremo C-terminal, **P(90-450)** y 4) a un fragmento sin los 89 residuos del extremo N-terminal y sin los últimos 364 residuos del extremo C-terminal, **P(90-231)**. Las regiones deletionadas corresponden a los dominios llamados “dedos de zinc” (que interaccionan con el DNA) del extremo N-terminal, y al dominio de interacción con la helicasa del extremo C-terminal de la DNA primasa. (**Figura 17 A**). Las cuatro construcciones incluyen la secuencia **P(211-222)**, que fue previamente descrita como homóloga a un ligando natural de HLA-B27 derivado de la región intracitoplasmática de la HC de esta molécula (Ramos *et al.* 2002a).

En experimentos preliminares de expresión transitoria, las cuatro construcciones fueron expresadas eficientemente en células HeLa-B\*2705 (**Figura 14 B**) y COS-7 (datos no mostrados). Por el contrario, sólo se obtuvieron transfectantes estables en células C1R con las construcciones **P(90-595)** y **P(90-450)** (**Figura 17 B y C**), pero no con las construcciones de la proteína bacteriana completa **P(1-595)** y del segmento **P(90-231)**.

Los niveles de expresión de las proteínas de fusión se midieron mediante citometría de flujo, siendo superiores para **P(90-450)** que para **P(90-595)**. En ambos casos la fluorescencia fue menor que con *GFP*, utilizada como control (**Figura 17 B**). Mediante inmunoprecipitación con anticuerpo anti-

*GFP* y Western blot se comprobó la expresión de las proteínas de fusión con el tamaño correcto (Figura 17 C).

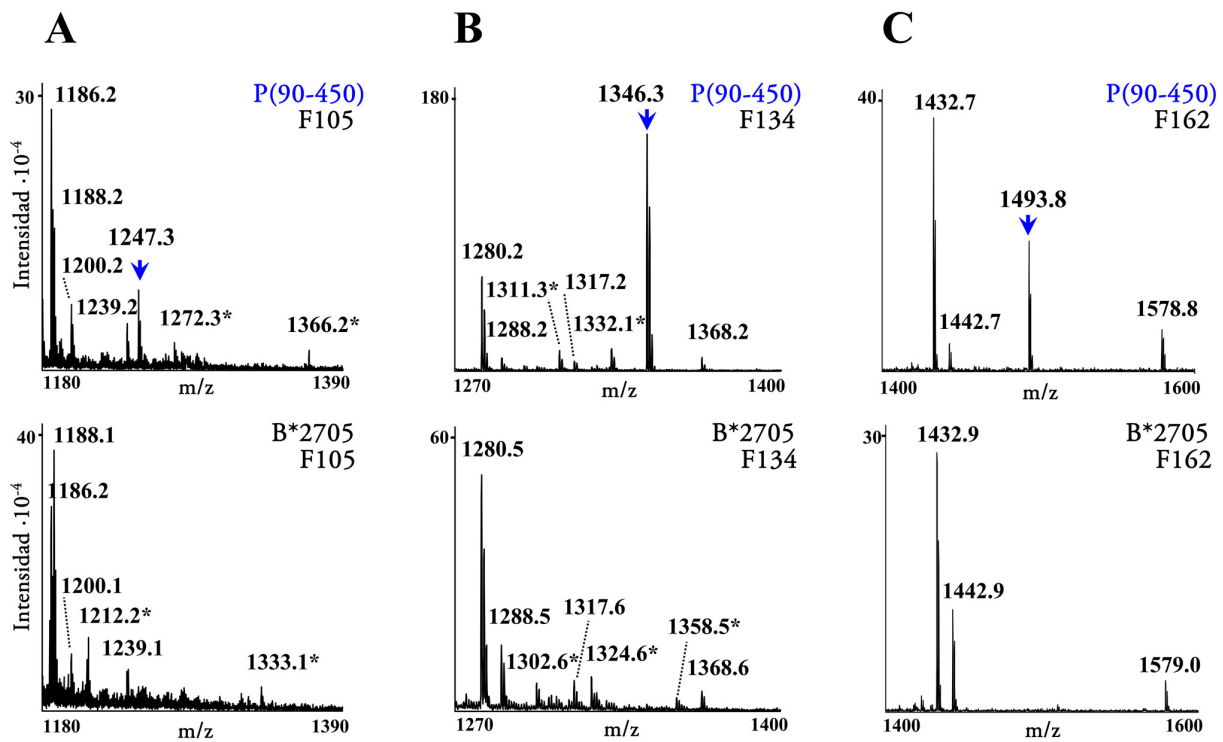


**Figura 17. Expresión de las construcciones de la DNA primasa (P) en células C1R-B\*2705.** A.- La *GFP* se fusionó al extremo N-terminal de la secuencia completa de la DNA primasa, P(1-595), o de fragmentos sin los residuos 1-89, P(90-595), o sin los residuos 1-89 y 451-595, P(90-450). Se muestra una representación esquemática de los dominios de la DNA primasa. Toprim, dominio topoisomerasa-primasa. La asignación de los dominios se realizó de acuerdo con la base de datos Pfam en [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk) (Bateman *et al.* 2004). B.- Análisis de la fluorescencia asociada a *GFP* en células C1R-B\*2705 (histograma no coloreado, control negativo), transfectadas con *GFP* (histograma negro, control positivo), P(90-595), y P(90-450). C.- Western blot donde se muestran con flechas la expresión de P(90-595), P(90-450) y *GFP* en los transfectantes estables de células C1R-B\*2705. Se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-*GFP*, y se reveló con el mismo anticuerpo. El número de células utilizado para las proteínas de fusión y *GFP* fue de  $2 \cdot 10^6$  y  $0.5 \cdot 10^6$ , respectivamente. La banda inespecífica corresponde a la cadena pesada del anticuerpo.

## R.2.2 Tres péptidos derivados de P(90-450) son presentados por HLA-B27 en células humanas

La búsqueda de los ligandos bacterianos de la DNA primasa de *Chlamydia trachomatis* presentados por HLA-B27, se realizó por análisis comparativo de los repertorios peptídicos unidos a HLA-B27, aislados a partir de células C1R-B\*2705 y transfectantes estables que expresan *GFP* o la proteína de fusión P(90-450). Se seleccionó este transfectante debido a su mayor nivel de expresión

(Figura 15 y 17 B) comparado con P(90-595). La estrategia utilizada fue esencialmente similar a la utilizada para comparar repertorios peptídicos de HLA-B27 (Sesma *et al.* 2002; Ramos *et al.* 2002b; Gomez *et al.* 2006), y consistió en el fraccionamiento de los repertorios peptídicos por HPLC, y en la comparación sistemática de las fracciones con el mismo tiempo de retención mediante MS de MALDI-TOF, como se ha descrito en el párrafo R.1.1.



**Figura 18. Identificación de tres péptidos presentados específicamente en el transfectante P(90-450).** A.- Se detectó en la fracción N° 105 del transfectante P(90-450) una señal peptídica diferencial  $m/z = 1247.3$ , ausente en la fracción equivalente de los controles. B.- y C.- En las fracciones N° 134 y N° 162 del transfectante P(90-450), se detectaron dos señales,  $m/z = 1346.3$  y  $m/z = 1493.8$ , ausentes en las fracciones de los controles. Las especies moleculares marcadas con una flecha (paneles superiores) fueron detectadas por MS de MALDI-TOF en el transfectante P(90-450) y no en las fracciones de HPLC correspondientes de los controles B\*2705 (paneles inferiores) o en las fracciones adyacentes (datos no mostrados), ni tampoco en el control con GFP (datos no mostrados). Las restantes especies moleculares fueron encontradas en la misma fracción o en fracciones adyacentes (marcadas con un asterisco). Los espectros se inspeccionaron y compararon en un rango de  $m/z$  entre 800 y 2000, por simplicidad sólo se muestra un rango apropiado de visualización para cada espectro. F= fracción. P, DNA primasa.

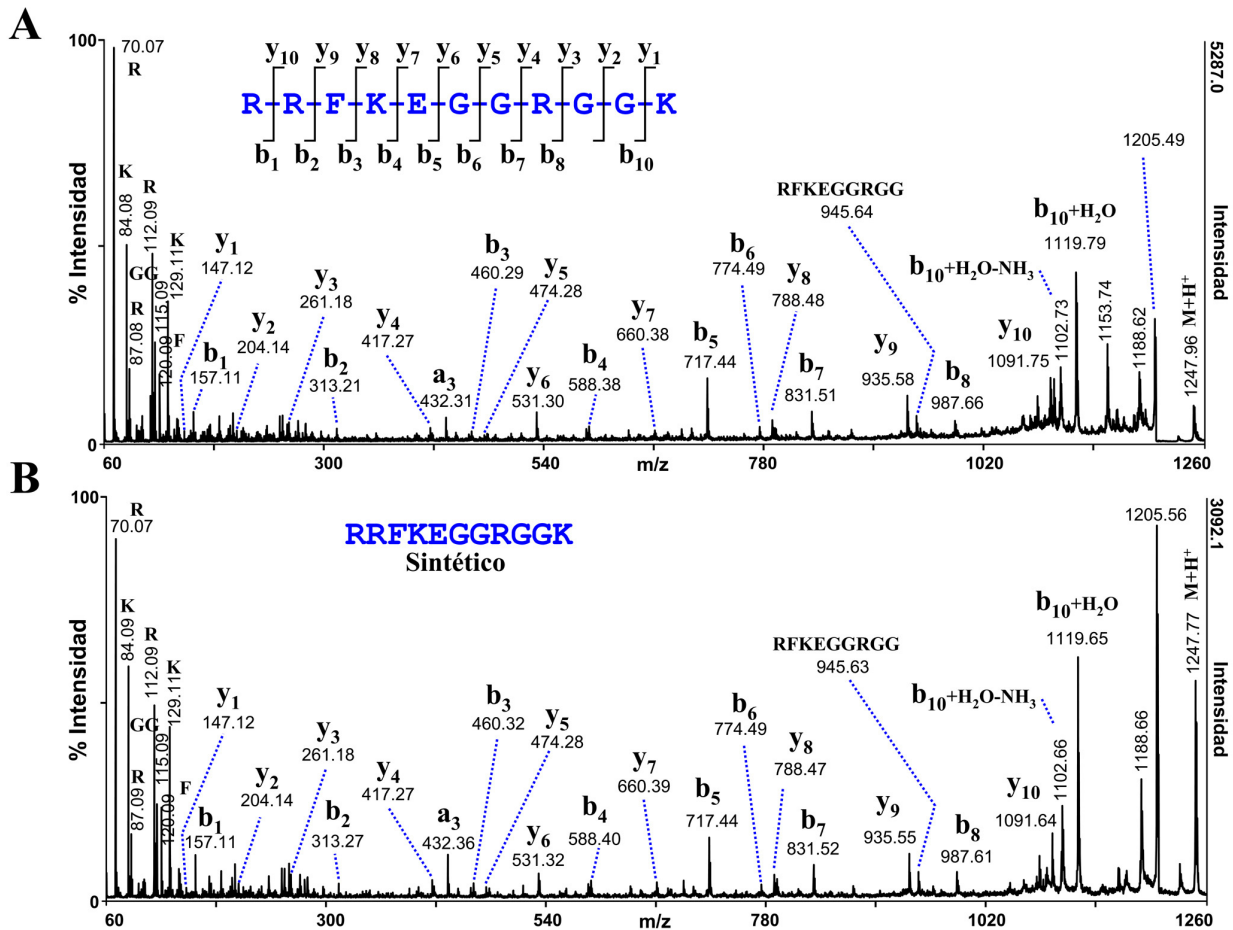
De un total de 1570 iones peptídicos, se detectaron 3 iones específicos en el transfectante P(90-450) y no en C1R-B\*2705 (Figura 18) y C1R-B\*2705-GFP (datos no mostrados): en la fracción de HPLC N° 105, el ión con una relación  $m/z = 1247.3$  (Figura 18 A), en la fracción N° 134 el ión  $m/z = 1346.3$  (Figura 18 B) y en la fracción N° 162 el ión  $m/z = 1493.8$  (Figura 18 C).

Estos resultados sugieren que la comparación directa de los repertorios peptídicos de HLA-B27 por MS es suficientemente sensible para detectar ligandos bacterianos procesados endógenamente en transfectantes de la proteína de *Chlamydia trachomatis* de interés.



### R.2.3 El péptido de *Chlamydia trachomatis* P(211-221) es procesado endógenamente y presentado por HLA-B27

El péptido correspondiente al ión  $m/z = 1247.3$  detectado específicamente en la fracción de HPLC N° 105 del repertorio peptídico del transfectante P(90-450) (Figura 18 A), se secuenció por MS/MS de MALDI-TOF-TOF a partir de  $2 \times 10^{10}$  células (Figura 19 A).



**Figura 19.** Secuenciación del ligando de HLA-B27 bacteriano P(211-222) del transfectante P(90-450). **A.-** Espectro MS/MS de MALDI-TOF-TOF del ión peptídico  $m/z = 1247.3$  de la figura 18 A. Se indica la asignación de iones y la secuencia de aminoácidos asignada. Se representan en un diagrama los iones “b” e “y” detectados. **B.-** Espectro MS/MS de MALDI-TOF-TOF del péptido sintético de la secuencia asignada en A.

La secuencia de este péptido es idéntica a los residuos 211-221 de la **DNA primasa** de *Chlamydia trachomatis*. La asignación se validó por comparación con el espectro de fragmentación MS/MS de MALDI-TOF-TOF del correspondiente péptido sintético (Figura 19 B). La búsqueda de este péptido frente a la base de datos del proteoma humano no reveló identidad alguna con proteínas humanas, confirmando el origen bacteriano de este péptido. P(211-221) posee sólo un residuo C-terminal menos que el péptido P(211-222), previamente descrito como homólogo a un ligando natural de HLA-B27 derivado del procesamiento del segmento intracitoplasmático de la propia molécula de HLA-B27 (Ramos *et al.* 2002a).

En consecuencia, este resultado indica que, un péptido de *Chlamydia trachomatis* con una alta homología de secuencia con un ligando natural de HLA-B27, se procesa de manera endógena y se presenta por HLA-B27 en células que expresan de manera estable la proteína de fusión **P(90-450)**.

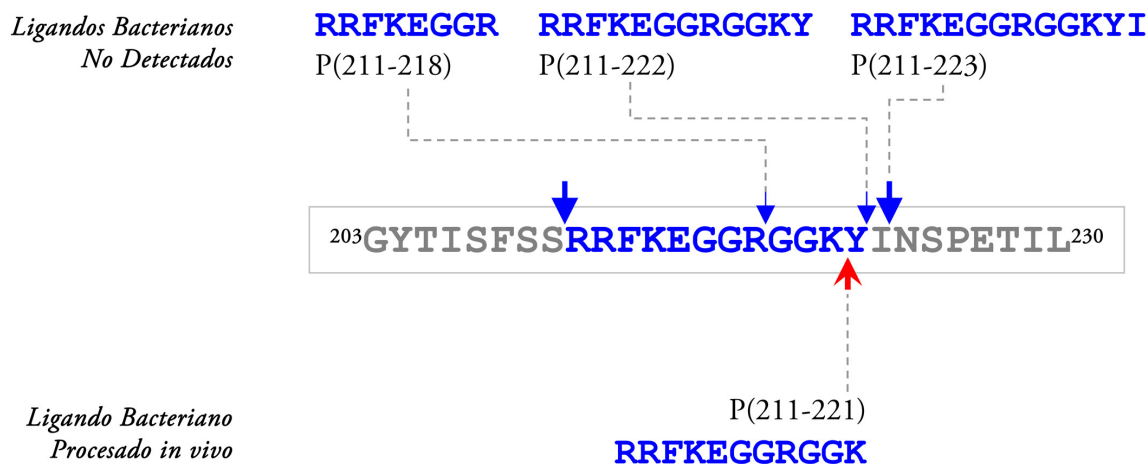
#### **R.2.4 El péptido P(211-222), y otros péptidos relacionados, no se detectaron en el *pool* peptídico del transfectante P(90-450)**

Para descartar la posibilidad de que pequeñas cantidades del péptido **P(211-222)** se hubieran escapado de la detección por MS de MALDI-TOF, se realizó una búsqueda específica de éste péptido (**Figura 20**). Se determinó el tiempo de retención en dos experimentos independientes empleando las mismas condiciones cromatográficas utilizadas para la separación de los *pools* peptídicos unidos a HLA-B\*2705 (fracciones número 119 y 121). Se inspeccionaron en alta resolución los espectros de MALDI-TOF de las fracciones de HPLC 115-123 del transfectante **P(90-450)**, en la región correspondiente al  $m/z$  del péptido **P(211-222)**. No se detectaron señales peptídicas consistentes con la presencia de este péptido. Se realizaron fragmentaciones MS/MS “a ciegas”, utilizando ESI-IT, en las mismas fracciones de HPLC de los iones  $m/z$ :  $(M+2H)^{+2}$ ,  $(M+3H)^{+3}$  y  $(M+4H)^{+4}$  del ión parental  $(M+1H)^{+1} = 1410.8$ . Tampoco se observaron fragmentaciones compatibles con esta secuencia peptídica en ningún caso.

De igual modo, se procedió a buscar los péptidos **P(211-218)** y **P(211-223)** (**Figura 20**), cuyos motivos estructurales también son compatibles con la unión a HLA-B27. Mediante MS de MALDI-TOF de las fracciones de HPLC en los rangos cromatográficos pertinentes, no se observaron señales compatibles con estos péptidos. Mediante ESI-IT, tampoco se detectaron fragmentaciones compatibles con estos péptidos por MS/MS “a ciegas” en el *pool* peptídico unido a HLA-B27 del transfectante **P(90-450)**.

Estos resultados sugieren que, dentro de los límites de detección de las técnicas de MS utilizadas en este estudio, los péptidos **P(211-222)**, **P(211-218)** y **P(211-223)** no se presentan endógenamente en células que expresan la proteína de fusión **P(90-450)**.



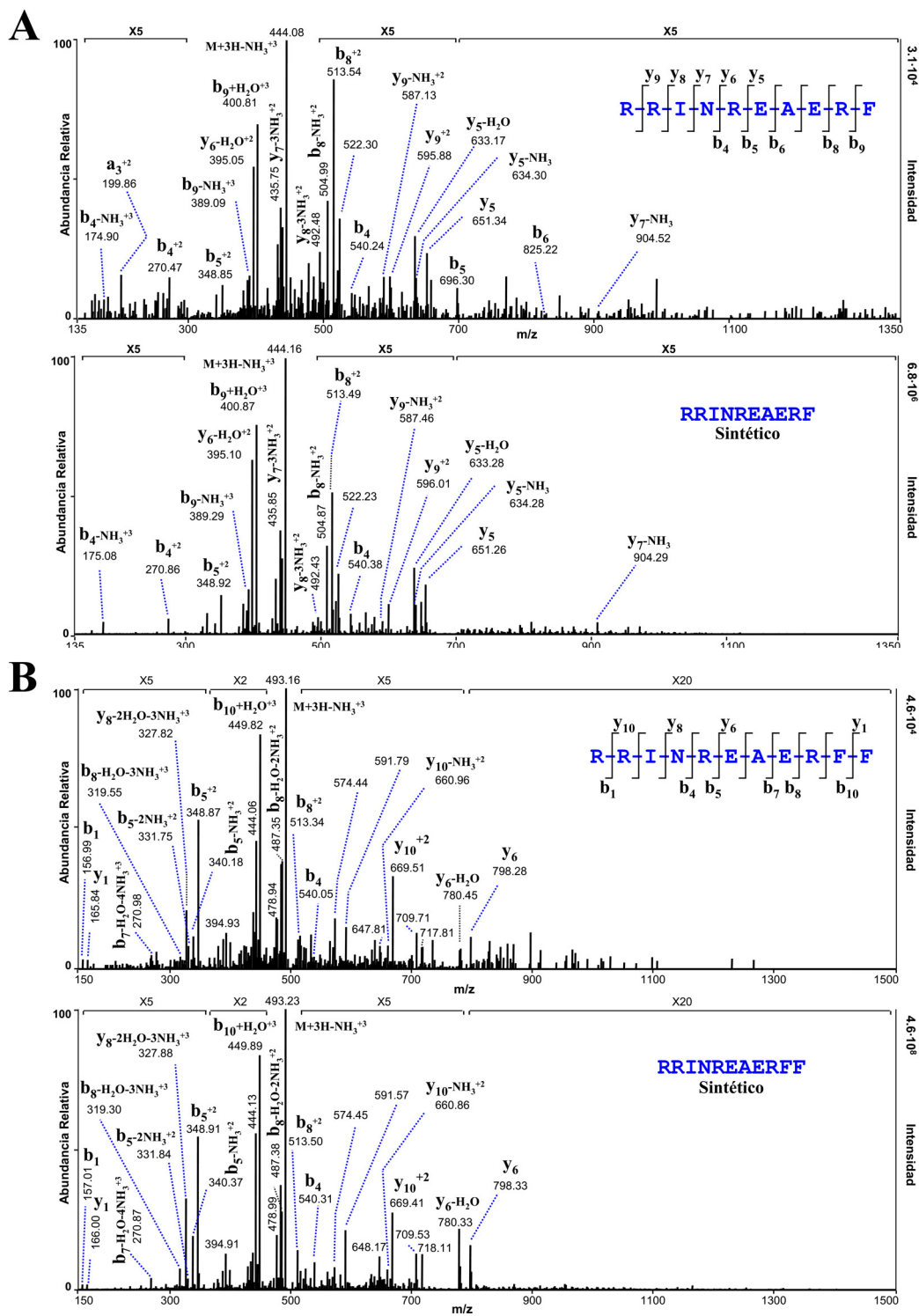


**Figura 20.** Esquema de los ligandos bacterianos procedentes de la región 211-223 detectados y no detectados de P(90-450). Previamente, se había descrito mediante digestión *in vitro* a partir de un precursor sintético con proteasoma 20S purificado, la generación de los péptidos P(211-218), P(211-222) y P(211-223) (Ramos *et al.* 2002a). Se realizó una búsqueda específica de estos ligandos bacterianos relacionados al ligando P(211-221), en el repertorio peptídico de HLA-B27 del transfectante P(90-450). Sin embargo, no se detectó ninguno de estos péptidos.

## R.2.5 Dos péptidos adicionales de la DNA primasa de *Chlamydia trachomatis* son procesados y presentados *in vivo* por HLA-B27

Los péptidos correspondientes a las especies moleculares  $m/z = 1346.3$  y  $m/z = 1493.8$  en las fracciones de HPLC N° 134 y N° 162 (**Figura 18 B y C**) respectivamente, se secuenciaron mediante MS/MS ESI-IT. Las secuencias asignadas (**Figura 21 A y 21 B**) fueron confirmadas con el espectro de fragmentación MS/MS del correspondiente péptido sintético.

Los dos péptidos secuenciados corresponden a los residuos 112-121 y 112-122 de la **DNA primasa** de *Chlamydia trachomatis*. La búsqueda de estos péptidos frente a la base de datos del genoma humano no reveló identidad alguna con proteínas humanas, confirmando el origen bacteriano de estos péptidos.



**Figura 21. Secuenciación de los ligandos de *Chlamydia trachomatis* P(112-121) y P(112-122) del transfectante P(90-450).** A.- Panel superior: espectro de MS/MS del ión  $m/z = 449.6$  de la fracción de HPLC N° 134 (correspondiente al ión en carga 1,  $[M+H]^+$ ,  $m/z = 1346.3$  de la Figura 18 B). Panel inferior: espectro de MS/MS de ión  $m/z = 449.6$  del péptido sintético de la secuencia asignada. B.- Panel superior: espectro de MS/MS del ión  $m/z = 498.6$  de la fracción de HPLC N° 162 (correspondiente al ión en carga 1,  $[M+H]^+$ ,  $m/z = 1493.8$  de la Figura 18 C). Panel inferior: espectro de MS/MS del ión  $m/z = 498.6$  del péptido sintético de la secuencia asignada. Todos los espectros pertenecen a fragmentaciones de los iones parentales en carga 3,  $[M+3H]^{+3}$ .

## R.2.6 Los péptidos P(112-121) y P(112-122) de *Chlamydia trachomatis* tienen una alta homología de secuencia con proteínas humanas

Para abordar la posibilidad de que existan ligandos naturales propios de HLA-B27 que posean mimetismo molecular con P(112-121) y P(112-122), realizamos una búsqueda de secuencias homólogas de proteínas humanas que contuvieran motivos de unión favorables a HLA-B27.

Secuencia <sup>a</sup>	Identidad <sup>b</sup> %	Proteína	SwissProt nº
<u>GRLKREA</u> EYF	60	proteína KCTD16 con dominios BTB/POZ	Q68DU8
<u>RRIAQ</u> EVQRF	60	Factor de elongación negativo C/D	Q8IXH7
<u>RRIDR</u> E EKAF	60	Precursor Caderina-10	Q9Y6N8
<u>RRIDR</u> E EKAFY	55	Precursor Caderina-10	Q9Y6N8
<u>RRIGK</u> EQELF	60	Treonil-tRNA sintetasa, precursor mitocondrial	Q9BW92
<u>RRIGK</u> EQELFF	64	Treonil-tRNA sintetasa, precursor mitocondrial	Q9BW92
<u>RRIGNS</u> LEKFF	55	Factor de transcripción Sperm 1 con dominio POU	Q8N7G0
<u>RRINR</u> QLEAL	60	Proteína 1 de unión a la Ciclina-G1	O43257
<u>RRINDE</u> IERQL	64	Proteína de unión a guanina, polipéptido q	Q6NT27
<u>RRITR</u> ENDRDR	55	Proteína hipotética DKFZp547E087	Q8ND77
<u>RRLDI</u> EAERL	60	Proteína con dominio <i>coiled-coil</i>	Q8NCY6
<u>RRLRG</u> KEAKRF	60 <sup>c</sup>	C <sub>1</sub> DNA FLJ41781 fis, clon IMR322018117	Q6ZW18
<u>RRLRG</u> KEAKRFF	58 <sup>c</sup>	C <sub>1</sub> DNA FLJ41781 fis, clon IMR322018117	Q6ZW18
<u>RRLSR</u> EQERL	60	Serina/treonina-quinasa proteína MRCK gamma	Q6DT37
<u>RRMF</u> KEADDF	55	Proteína DCP1 / actividad peptidil-dipeptidasa A	Q15540
<u>RRYGR</u> DATRF	60	Proteína <i>Docking 4</i>	Q8TEW6

**Tabla 1. Secuencias de proteínas humanas con residuos de unión óptimos a HLA-B27 y homología de secuencia > 50% con P(112-121) y P(112-122).** <sup>a</sup>Se subrayan los residuos idénticos a los péptidos bacterianos. <sup>b</sup>Relativo al péptido bacteriano de igual longitud. <sup>c</sup>Secuencia alineada teniendo en cuenta la delección de un residuo en el péptido bacteriano, relativo a la secuencia humana.

P(112-121) y P(112-122) se enfrentaron a la base de datos del proteoma humano buscando secuencias que contengan una identidad > 50% con la respectiva secuencia bacteriana y el motivo de unión universal a HLA-B27: Arg en posición 2 (Lopez de Castro *et al.* 2004). Se aplicaron diferentes filtros en distintas posiciones en base a la presencia de residuos favorecidos y desfavorecidos, observados en los ligandos naturales de HLA-B27 (Lopez de Castro *et al.* 2004). Se eliminaron las secuencias que tuvieran residuos poco frecuentes o no observados en los ligandos de HLA-B27 : 1) presencia de residuos ácidos en p1, 2) presencia de residuos C-terminales ácidos o polares. Se obtuvieron 33 secuencias humanas en este paso. A continuación se seleccionaron secuencias con motivos de unión óptimos en las

posiciones: p1, p3 y pΩ. Se consideraron residuos óptimos aquellos que poseen una alta frecuencia entre los residuos naturales de HLA-B\*2705: Gly o residuos básicos en p1, residuos alifáticos o aromáticos (excepto Ala) en p3, y residuos básicos, alifáticos o aromáticos (excepto Ala) en pΩ.

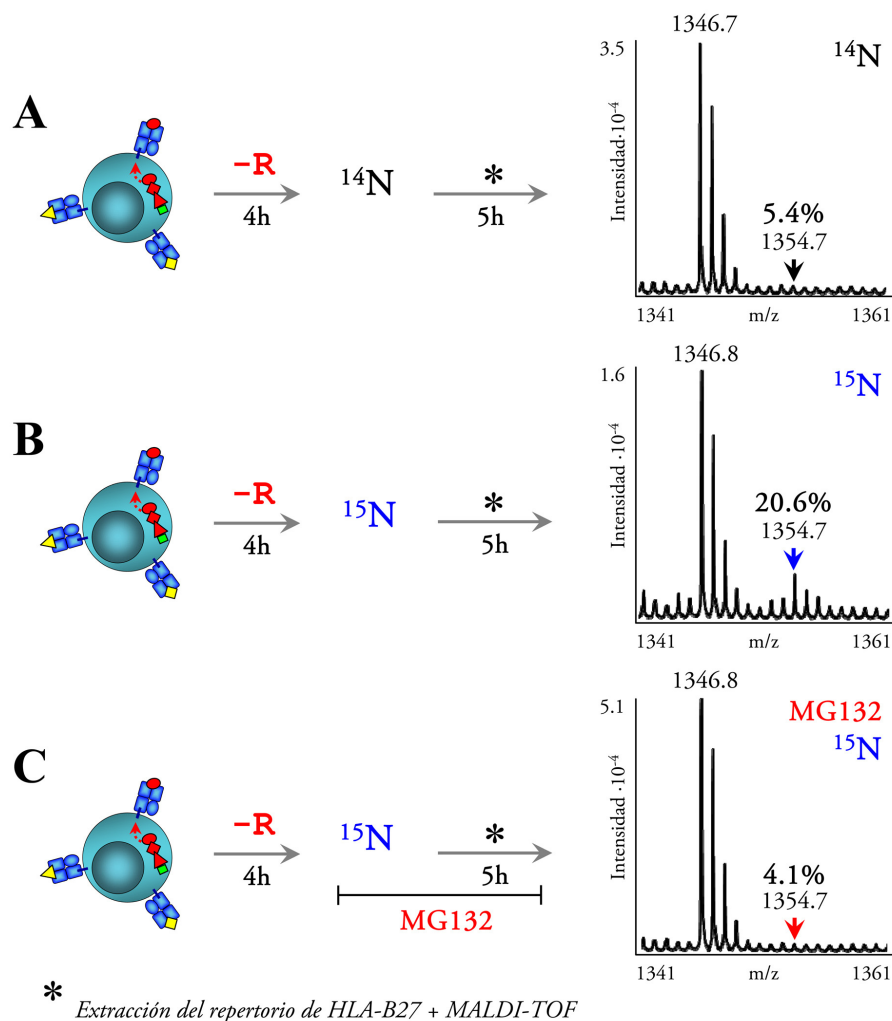
Se encontraron en total 16 secuencias humanas que se ajustaron a los criterios de selección utilizados (**Tabla 1**). Estos resultados indican que el proteoma humano contiene múltiples secuencias proteicas que tienen motivos de unión óptimos a HLA-B27 y poseen una identidad de secuencia > 50% con dos ligandos de *Chlamydia trachomatis* presentados por HLA-B27.

### **R.2.7 La proteína de fusión P(90-450) se procesa de manera dependiente de proteasoma**

Para determinar si los ligandos bacterianos de HLA-B27 se procesan de manera dependiente de proteasoma, se marcó metabólicamente el transfectante **P(90-450)** con  $^{15}\text{N}_2$ -Arg en ausencia o en presencia del inhibidor de proteasoma MG132. Esta aproximación fue usada previamente para determinar la dependencia de proteasoma de los ligandos de HLA-B\*2705 (Marcilla *et al.* 2007).

Debido a que la Arg pesada contiene 2 átomos de  $^{15}\text{N}$ , su incorporación se traduce en un incremento específico de 2 Da por residuo de Arg en la masa molecular de cualquier péptido que contenga Arg. Como consecuencia de la drástica disminución en la viabilidad celular al utilizar inhibidores de proteasoma, el tiempo de marcaje fue de cinco horas de manera que el *pool* intracelular de los péptidos no marcados no se elimina totalmente. En estas condiciones el espectro de MS de MALDI-TOF de un péptido marcado es similar al espectro de un péptido no marcado excepto en el incremento selectivo de la correspondiente especie isotópica.

De los tres péptidos de *Chlamydia trachomatis* identificados, únicamente el más abundante **P(112-121)** fue apto para realizar el análisis mediante este método, debido a la mayor intensidad de la señal correspondiente en el espectro de MS de MALDI-TOF. Tras el marcaje metabólico, (**Figura 22 B**) se observó un incremento significativo en la intensidad del pico  $[(M+8)+H]^+$  (donde M es el pico monoisotópico), correspondiente a la presencia de 4 residuos de Arg en el péptido **P(112-121)**. Este incremento fue totalmente eliminado en presencia de MG132 (**Figura 22 C**), indicando que este ligando se procesa de manera dependiente de proteasoma.



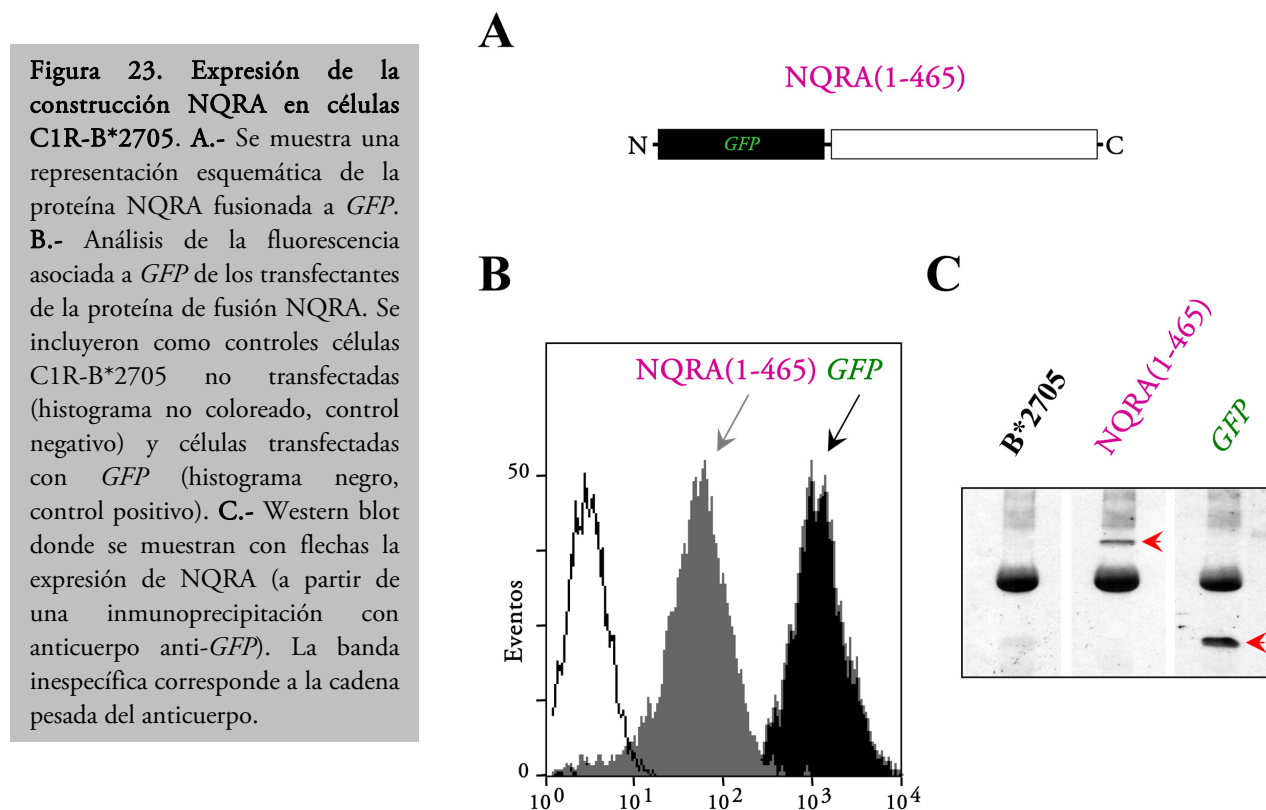
**Figura 22. Análisis de la dependencia de proteasoma del péptido bacteriano P(112-121).** Espectros de MALDI-TOF del péptido RRINREAERF de *Chlamydia trachomatis* del transfectante P(90-450). **A.-** Sin marcaje metabólico [ $^{14}\text{N}$ ] $_2$ -Arg. **B.-** Con marcaje metabólico [ $^{15}\text{N}$ ] $_2$ -Arg en ausencia de inhibidor de proteasoma. **C.-** Con marcaje metabólico [ $^{15}\text{N}$ ] $_2$ -Arg en presencia de 20  $\mu\text{M}$  MG132. El espectro del péptido del transfectante sin marcar muestra la distribución normal de las especies isotópicas. Tras el marcaje con [ $^{15}\text{N}$ ] $_2$ -Arg, se observa un incremento selectivo en la intensidad del pico [(M+8)+H] $^+$  (M es el pico monoisotópico). En presencia de MG132 no se observa este incremento en la intensidad. Se indica en cada una de las tres situaciones el porcentaje de intensidad del pico [(M+8)+H] $^+$  relativo al pico monoisotópico.

### R.3 NQRA: procesamiento endógeno y presentación de ligandos de HLA-B27

La proteína NADH-quinona reductasa transportadora de  $\text{Na}^+$ , **NQRA**, codificada por el gen CT634, posee secuencias peptídicas capaces de unirse *in vitro* a HLA-B27 cuando se adicionan exógenamente como péptidos sintéticos, y ser reconocidas por CTLs de pacientes con ReA inducida por *Chlamydia trachomatis* (Kuon *et al.* 2001). **NQRA** es una proteína de 465 aminoácidos que está implicada en el transporte bidireccional de  $\text{Na}^+$  entre el citoplasma y el periplasma bacterianos, generando un potencial electroquímico de  $\text{Na}^+$  en la respiración aeróbica (Zhou *et al.* 1999). Mediante análisis proteómico de células infectadas con *Chlamydia trachomatis* se determinó que **NQRA** es un componente natural de los cuerpos elementales (Skipp *et al.* 2005).

### R.3.1 Expresión estable de la NQRA bacteriana en células C1R-B\*2705

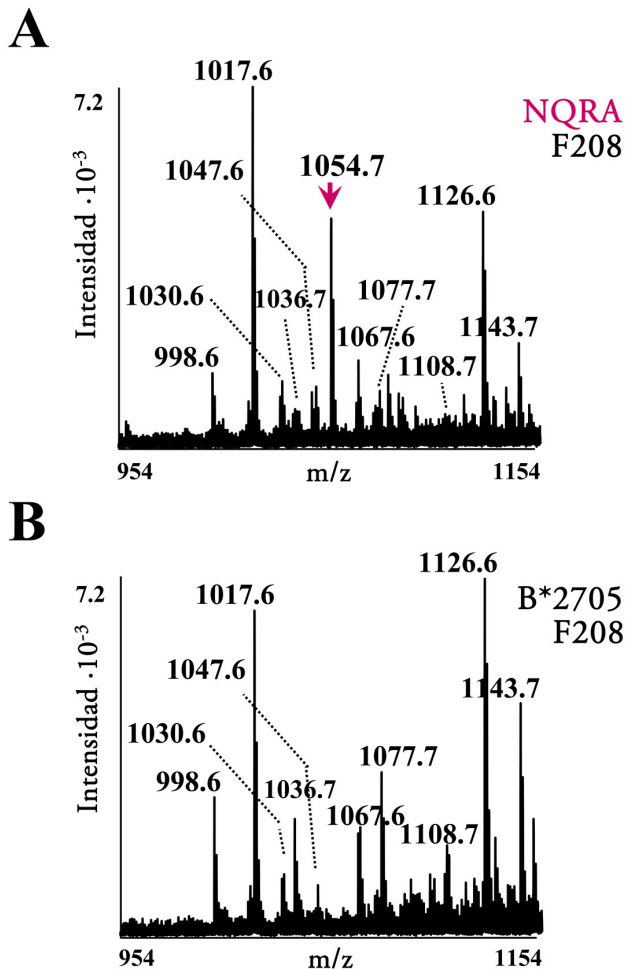
Se diseñó una construcción donde la *GFP* se situó en el extremo N-terminal de la NQRA y se obtuvieron transfectantes estables en células humanas C1R-B\*2705 (Figura 23 A). Se verificó la expresión estable de las proteínas de fusión mediante citometría de flujo (Figura 23 B). Posteriormente, se confirmó, por inmunoprecipitación con anticuerpo anti-*GFP* y Western blot, la banda del correspondiente peso molecular (Figura 23 C).



### R.3.2 El único ligando de HLA-B27 de *Chlamydia trachomatis* detectado específicamente en el transfectante NQRA no está relacionado con el epítipo de células T predicho

Se aislaron los péptidos unidos a HLA-B27 de células C1R-B\*2705, de células C1R-B\*2705 transfectadas con *GFP* (ambas utilizadas como controles) y de células C1R-B\*2705 transfectadas con la proteína de fusión NQRA. Mediante cromatografía de HPLC se fraccionaron los *pools* peptídicos y se analizaró cada una de las fracciones individuales de HPLC por MS de MALDI-TOF, en células que expresaron o no la proteína bacteriana. Se compararon 4895 iones peptídicos procedentes del transfectante NQRA contra 4958 y 4526 iones derivados de las células C1R-B\*2705 y del transfectante de *GFP* en células C1R-B\*2705, respectivamente. Únicamente se detectó un ión peptídico específico en

el transfectante **NQRA**:  $m/z = 1054.7$  en la fracción de HPLC N° 208 (**Figura 24 A**), el cual no se detectó ni en células C1R-B\*2705 (**Figura 24 B**) ni en células C1R-B\*2705 transfectadas con *GFP* (no mostrado). Este péptido, presentó unas características tanto en su tiempo de retención (ver R.3.3) como en su masa molecular, no relacionadas al péptido MRDHTITLL, predicho por Kuon *et al* (Kuon *et al.* 2001), correspondiente a los residuos 330-338 de **NQRA**.



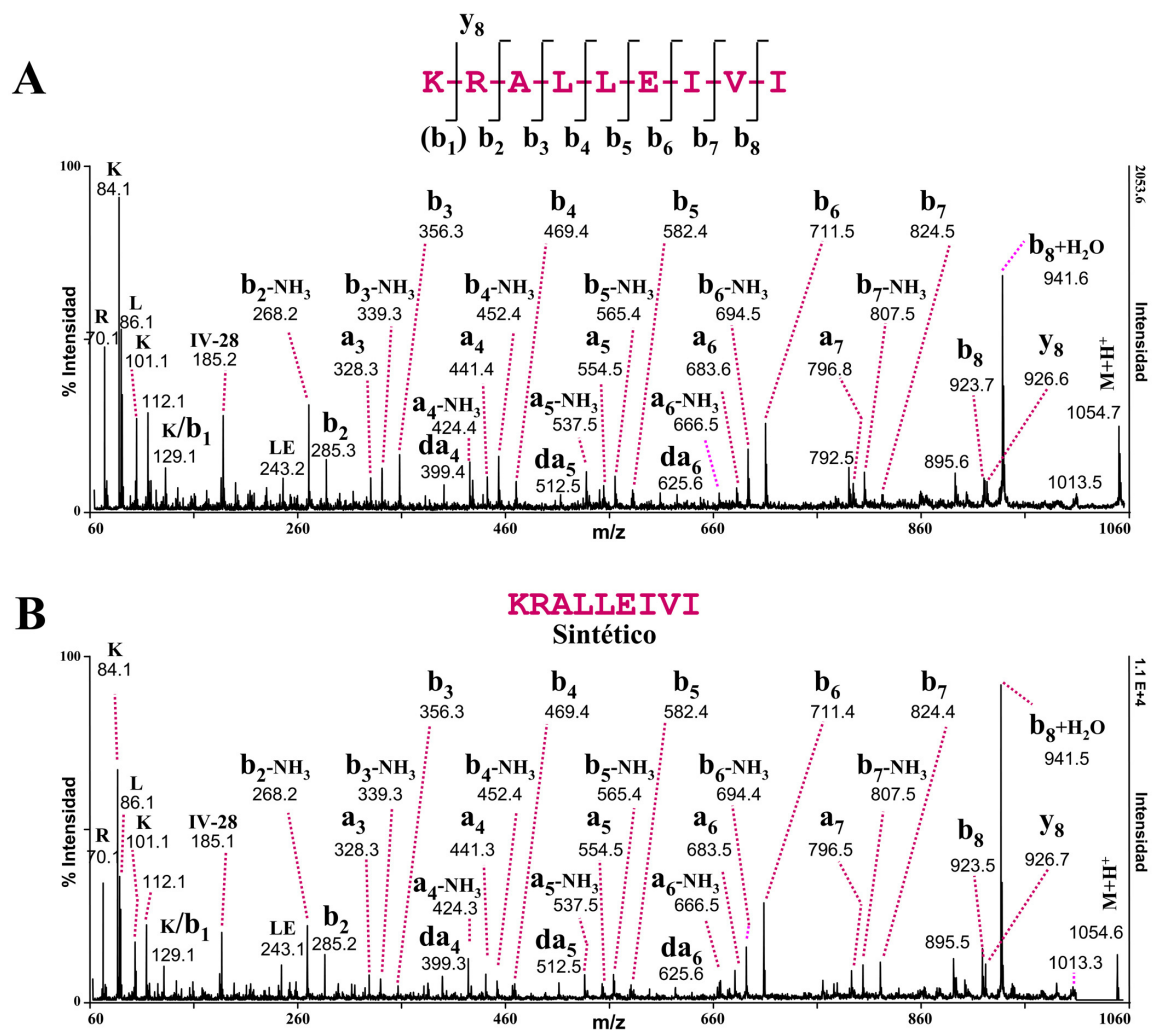
**Figura 24. Detección de un ligando específico de HLA-B27 en el transfectante NQRA. A.-** Espectro de MS de MALDI-TOF de la fracción N° 208 donde se detectó el ión  $m/z = 1054.7$ . **B.-** Esta señal no se detectó en las fracciones correlativas de la célula C1R-B\*2705 utilizada como control, ni tampoco en la célula con *GFP* (no mostrado).

La secuencia de aminoácidos del péptido se determinó mediante MS/MS de MALDI-TOF-TOF y se asignó como un nonámero, perteneciente a los residuos 86-94 de la proteína **NQRA** de *Chlamydia trachomatis*: KRALLEIVI (**Figura 25 A**). La asignación de esta secuencia se confirmó por comparación con el espectro de fragmentación MS/MS del correspondiente péptido sintético (**Figura 25 B**).

La búsqueda de este péptido frente a la base de datos del proteoma humano no reveló identidad alguna con proteínas humanas, confirmando el origen bacteriano de este ligando. El péptido **NQRA(86-94)** no está relacionado con el epítipo de células T predicho de esta proteína, **NQRA(330-338)**: MRDHTITLL, el cual se describió en base a la aplicación de algoritmos informáticos y por ser reconocido por CTLs *in vitro* (Kuon *et al.* 2001). Por el contrario, el péptido presentado



endógenamente NQRA(86-94) no fue predicho por los algoritmos teóricos en el estudio mencionado (Kuon *et al.* 2001).



**Figura 25. Secuenciación del ligando de HLA-B27 bacteriano NQRA(86-94) del transfectante NQRA(1-465).** A.- Espectro MS/MS de MALDI-TOF-TOF del ión  $m/z = 1054.7$  de la fracción N° 208 (Figura 24 A). Se indica la asignación de iones y la secuencia de aminoácidos asignada. Se representan en un diagrama los iones “b” e “y” detectados. B.- Espectro MS/MS de MALDI-TOF-TOF del péptido sintético de la secuencia asignada en A. La asignación del ión  $m/z = 129.1$  es ambigua, ya que es consistente con el ión b1 y con el ión imonio de Lys.

### R.3.3 NQRA(330-338) no se presenta por HLA-B27 *in vivo*

Para descartar la posibilidad de que pequeñas cantidades del péptido NQRA(330-338) pudieran no haber sido detectadas en la comparación global de los *pools* peptídicos de HLA-B27, se realizó una búsqueda específica de este péptido mediante la determinación de la posición de elución del péptido sintético correspondiente, empleando las mismas condiciones cromatográficas utilizadas para el fraccionamiento de los *pools* peptídicos unidos a HLA-B\*2705. Esta posición corresponde a la fracción de HPLC N° 181. Se buscó la señal peptídica teórica, 1099.6, en un rango de  $m/z$  ampliado de cada



uno de los espectros de MALDI-TOF correspondientes a la fracción de elución de HPLC del péptido sintético (Figura 26)  $\pm$  6 fracciones (no mostrado).

A

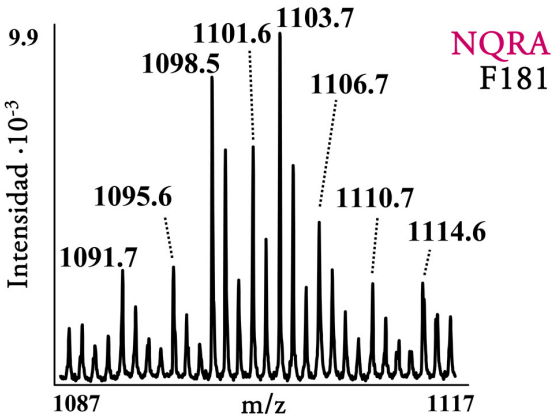
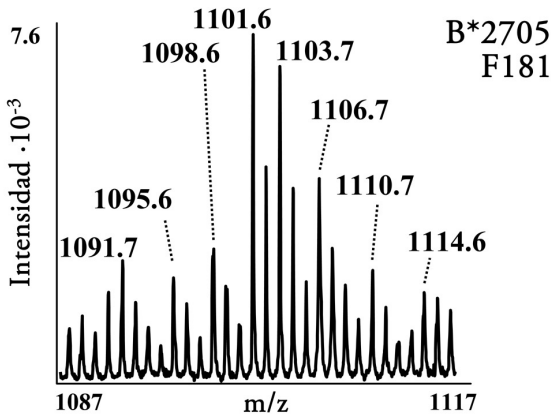
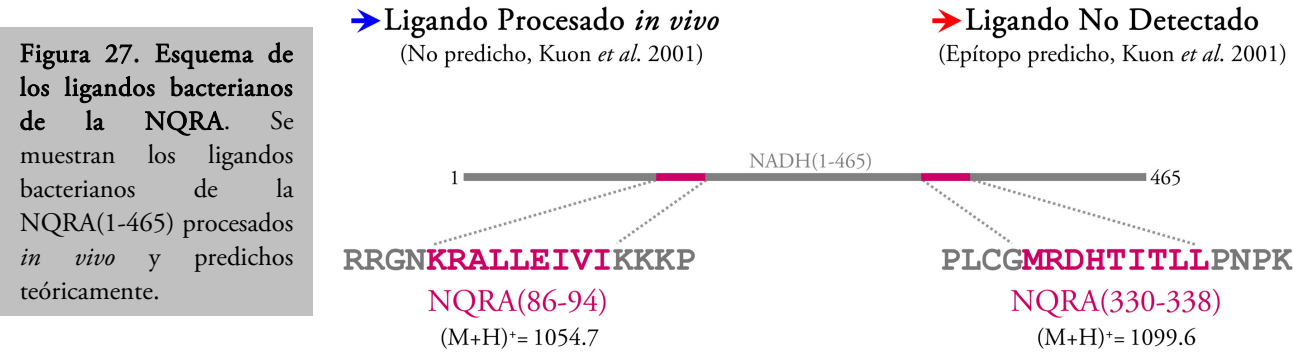


Figura 26. No se detectó el ligando bacteriano NQRA(330-338) en el transfectante NQRA(1-465). A.- Espectro MS de MALDI-TOF de la fracción N° 181. No se detecto el ión m/z = 1099.6, ni en la fracción de elución del péptido sintético, ni en ninguna de las fracciones adyacentes del transfectante NQRA(1-465). B.- Se utilizaron como controles la célula C1R-B\*2705, y la célula C1R-B\*2705 con GFP (no mostrado).

B



También se determinó la posición de elución del péptido sintético NQRA(330-338) con el residuo de Met oxidado, en condiciones similares a las que cualquier péptido estaría expuesto según nuestros protocolos (0.1% TFA en agua) y en condiciones más oxidantes (10% TFA en agua). Dentro de los límites de detección del instrumento de MS de MALDI-TOF-TOF utilizado, no se detectó ningún ión peptídico consistente con la presencia del péptido NQRA(330-338) en cualquiera de los casos (Figura 27).

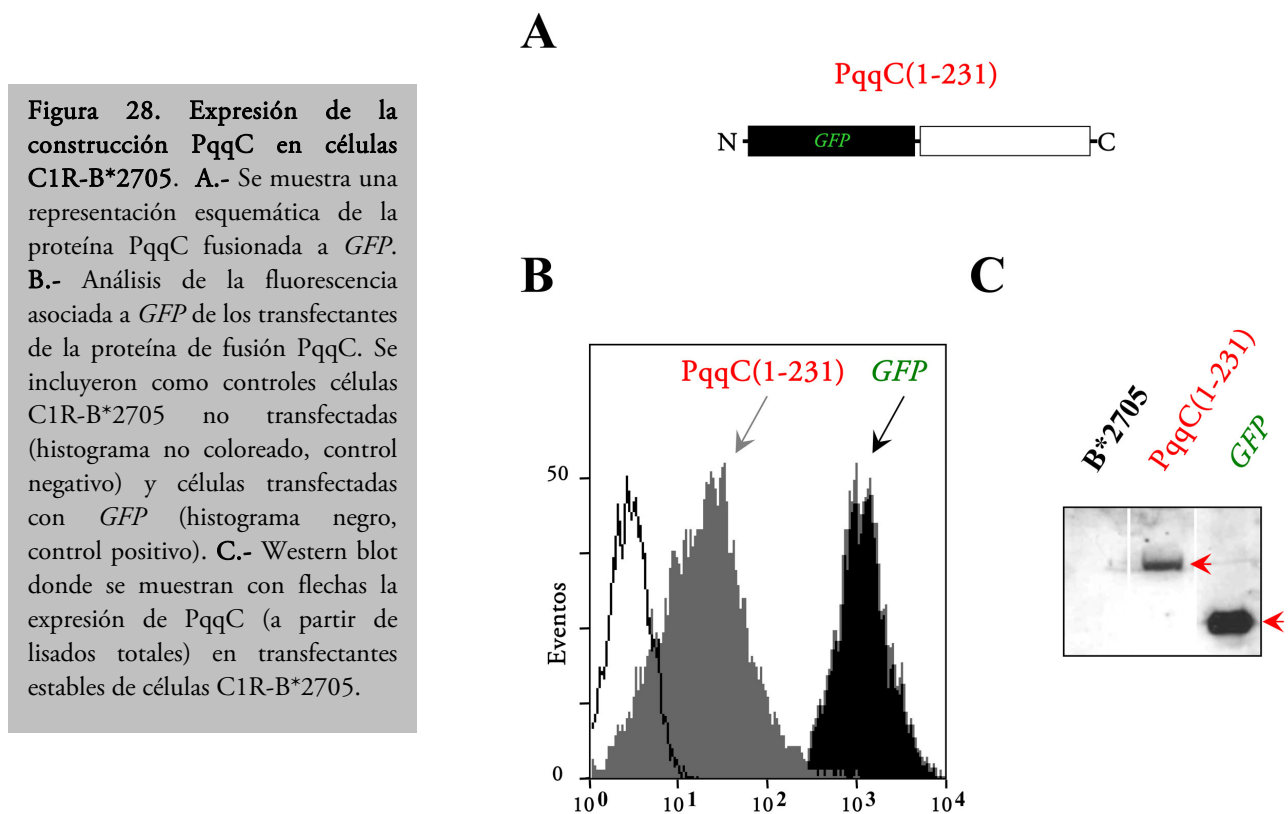


## R.4 PqqC: procesamiento endógeno y presentación de ligandos de HLA-B27

Un péptido sintético del producto génico de CT610 de *Chlamydia trachomatis* es reconocido por CTLs *in vitro* en pacientes con ReA (Kuon *et al.* 2001). CT610 codifica para la proteína de 231 aminoácidos tipo pirroloquinolina-quinona sintasa: **PqqC**. En pacientes con infección urogenital por *Chlamydia trachomatis*, la **PqqC** estimula la secreción de INF- $\gamma$  en células mononucleares de sangre periférica (Olsen *et al.* 2007). Esta proteína se expresa en su estado nativo como un homodímero, el cual se secreta al citoplasma de la célula hospedadora y actúa como una toxina específica de *Chlamydia trachomatis* induciendo apoptosis en líneas celulares de mamíferos (Stenner-Liewen *et al.* 2002b; Schwarzenbacher *et al.* 2004a; Magnusson *et al.* 2004; Schwarzenbacher *et al.* 2004b). La proteína **PqqC** esta presente de manera natural en los cuerpos elementales de esta bacteria (Skiip *et al.* 2005).

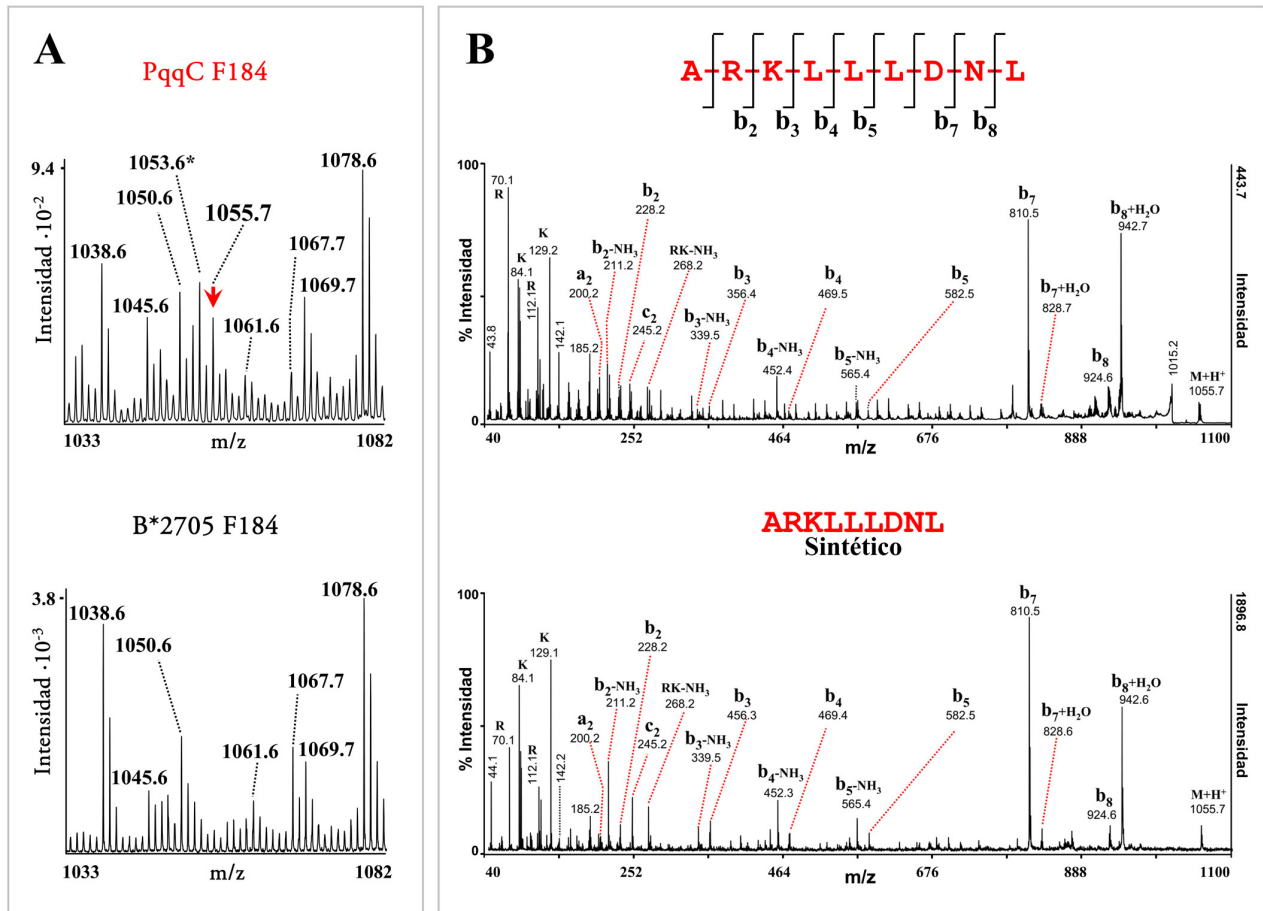
### R.4.1 Expresión estable de la PqqC bacteriana en células C1R-B\*2705

Se generaron transfectantes estables en células humanas C1R-B\*2705 de la proteína **PqqC** fusionada al extremo C-terminal de la *GFP* (**Figura 28 A**). Se verificó la expresión estable de las proteínas mediante citometría de flujo (**Figura 28 B**) y se confirmó la banda correspondiente al peso molecular correcto por Western blot con anticuerpo anti-*GFP* (**Figura 28 C**).



## R.4.2 Dos péptidos diferenciales son presentados por HLA-B27 en el transfectante de la PqqC

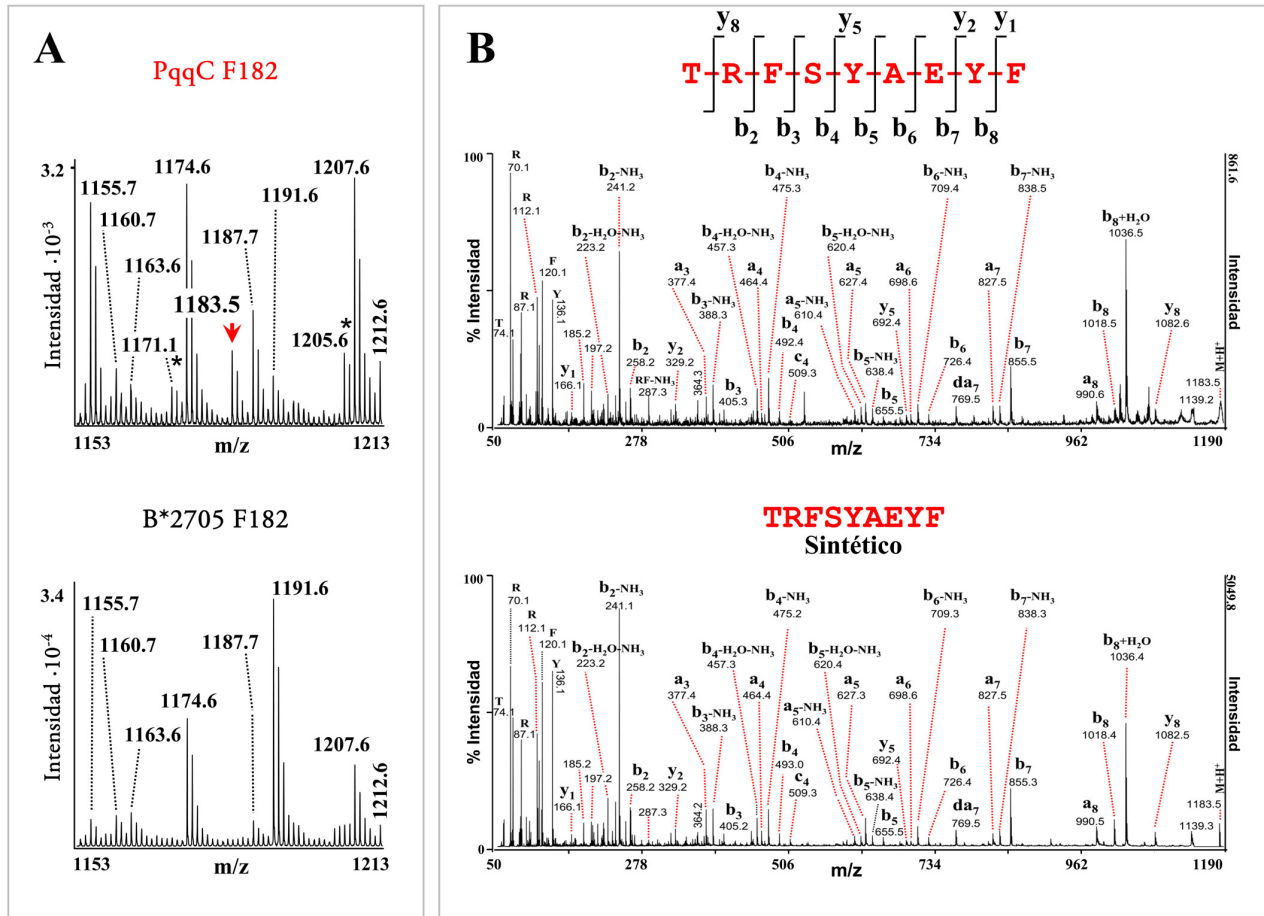
El procesamiento y presentación endógenos de los ligandos de HLA-B27 de la PqqC se analizó siguiendo la misma estrategia que en las proteínas anteriormente mencionadas. La comparación sistemática de los espectros de MS de MALDI-TOF de los repertorios peptídicos unidos a HLA-B27 separados por HPLC se llevó a cabo sobre un total de 4905 iones peptídicos provenientes del transfectante PqqC.



**Figura 29.** El ligando detectado en el transfectante PqqC(1-231) coincide con el epítipo de células T predicho. Detección y secuenciación del ligando de HLA-B27 bacteriano PqqC(86-94). **A.-** Espectro MS de MALDI-TOF de la fracción N° 184 del transfectante PqqC(1-231). Se muestra con una flecha el ión diferencial,  $m/z = 1055.7$ , detectado en PqqC y no en las fracciones correlativas de las células C1R-B\*2705, utilizadas como control y en células con GFP (no mostrado). El ión  $m/z = 1053.6$  marcado con un asterisco corresponde a un ión compartido, el cual se detectó en la fracción N° 185 de las células C1R-B\*2705. **B.-** Panel superior: espectro MS/MS de MALDI-TOF-TOF del ión  $m/z = 1055.7$  de la fracción N° 184 de PqqC. Se indica la asignación de iones y la secuencia de aminoácidos asignada. Se representan en un diagrama los iones “b” detectados, no se detectaron iones “y”. El fondo observado en el espectro MS/MS de la fracción N° 184 proviene del detergente utilizado para la lisis celular, Igepal CA-630, octilfenil-polietilenglicol:  $(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$ . Los iones del detergente están espaciados periódicamente entre sí por  $m/z = 44$ . Se distinguen series relacionadas por diferencias de  $m/z = 16$ . Panel inferior: espectro MS/MS de MALDI-TOF-TOF del péptido sintético de la secuencia asignada.

Se detectaron dos especies moleculares específicas de este transfectante (Figuras 29 A y 30 A, panel superior), los cuales no se encontraron en las fracciones de HPLC equivalentes de las células

C1R-B\*2705 (Figuras 29 A y 30 A, panel inferior), ni tampoco en el transfectante C1R-B\*2705 que expresa *GFP* (no mostrado). En la fracciones de HPLC N° 184 (Figura 29 A) y N° 182 (Figura 30 A) se encontraron las especies moleculares diferenciales  $m/z = 1055.7$  y  $m/z = 1183.5$ , respectivamente.



**Figura 30. Identificación de un ligando de HLA-B27 no bacteriano ABS2(2-10) en el transfectante PqqC(1-231).** Identificación de un ligando propio de HLA-B27 expresado diferencialmente en el transfectante PqqC. A.- Espectro MS de MALDI-TOF de la fracción N° 182 del transfectante PqqC(1-231), se muestra con una flecha el ión diferencial  $m/z = 1183.5$  detectado en PqqC, y no en las fracciones correlativas de las células C1R-B\*2705, utilizadas como control y en células con *GFP* (no mostrado). Los iones  $m/z = 1171.1$  y  $m/z = 1205.6$  marcados con un asterisco corresponden a dos iones comunes de la fracción 183 de esta preparación, y de otro experimento independiente, en células control C1R-B\*2705. B.- Panel superior: espectro MS/MS de MALDI-TOF-TOF del ión  $m/z = 1183.5$  de la fracción N° 182 de PqqC. Se indica la asignación de iones y la secuencia de aminoácidos asignada. Se representan en un diagrama los iones “b” e “y” detectados. Panel inferior: espectro MS/MS de MALDI-TOF-TOF del péptido sintético de la secuencia asignada.

#### R.4.3 El epítipo predicho de células T de la PqqC de *Chlamydia trachomatis* es procesado endógenamente y se presenta por HLA-B27

El ión peptídico diferencial hallado en la fracción de HPLC N° 184 con  $m/z = 1055.7$  (Figura 29 A, panel superior), posee el mismo tiempo de retención y la misma masa molecular que el epítipo de células T predicho de esta proteína, perteneciente a los residuos 70-78: ARKLLLDNL de la PqqC (Kuon *et al.* 2001). Se secuenció por MS/MS de MALDI-TOF-TOF la especie molecular  $m/z = 1055.7$  (Figura 29 B, panel superior) y se confirmó su asignación como el epítipo PqqC(70-78) por

comparación con el espectro de fragmentación MS/MS de MALDI-TOF-TOF del péptido sintético (Figura 29 B, panel inferior). La búsqueda de este péptido frente a la base de datos del proteoma humano no reveló identidad alguna con proteínas humanas, confirmando el origen bacteriano de este epítipo.

#### R.4.4 Un ligando diferencial de HLA-B27 no bacteriano en el transfectante PqqC

La secuencia del ión peptídico diferencial  $m/z = 1183.5$  detectado en la fracción de HPLC N° 182 del transfectante de la **PqqC**, se determinó por MS/MS de MALDI-TOF-TOF y se asignó como TRFSYAEYF (Figura 30 B). La búsqueda de este péptido en las bases de datos del proteoma humano mostró una identidad completa con una secuencia de una proteína humana. Esta secuencia no pertenece a la proteína bacteriana **PqqC**, sin embargo coincide exactamente con la región N-terminal (residuos 2-10) de la proteína con dominios repetidos de anquirina y caja SOCS 2 humana: **ASB2** (SwissProt n° Q96Q27). La **ASB2** está implicada en el reconocimiento de sustratos del proteasoma, siendo un componente de los complejos E3 ubiquitin-ligasas (Heuze *et al.* 2005).

#### R.4.5 Los ligandos bacterianos NQRA(86-94) y PqqC(70-78) poseen una alta homología de secuencia con proteínas humanas

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas al péptido bacteriano **NQRA(86-94)**: **KRALLEIVI**, en las bases de datos del proteoma humano. En esta búsqueda, se identificó una secuencia humana con una alta homología, derivada de la proteína tipo DnaJ: **DnaJB14** (SwissProt n° Q8TBM8) (Tabla 2).

Secuencia <sup>a</sup>	Identidad <sup>b</sup> %	Organismo	Proteína (residuos)	SwissProt n°
<b>KRALLEIVI</b>	---	<i>Chlamydia trachomatis</i>	NADH-quinona reductasa transportadora de Na <sup>+</sup> subunidad A, NQR(86-94)	O84639
<b>ARALLEIIM</b>	66.7	<i>Homo sapiens</i>	Proteína tipo DnaJ, DNAJB14(43-51)	Q8TBM8
<b>ARKLLLDNL</b>	---	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Proteína tipo pirroloquinolona-quinona sintasa, PqqC(70-78)	O84616
<b>LRKLLLDQV</b>	66.7	<i>Homo sapiens</i>	Exportina 6, Exp6(172-180)	Q96QU8

Tabla 2. Homología entre los ligandos bacterianos de NQRA Y PqqC presentados endógenamente por HLA-B27 y secuencias de proteínas humanas. <sup>a</sup>Se subrayan los residuos idénticos a los péptidos bacterianos. <sup>b</sup>Relativo al péptido bacteriano de igual longitud.

Las siguientes características confieren especial significación a esta homología. Primero, el péptido homólogo humano contiene los residuos de unión favorables a HLA-B27, incluyendo Arg en posición 2 (p2), y un residuo C-terminal no polar (Met en p9) y un residuo N-terminal pequeño (Ala en p1). Segundo, seis de un total de nueve residuos (66.7%) del péptido humano **DnaJB14(43-51)**:

ARALLEIIM son idénticos a los residuos del péptido bacteriano. Estos residuos incluyen Arg en p2, el residuo de anclaje secundario Ala en p3, y casi la totalidad de la región central del péptido, que en los ligandos de MHC de Clase I esta expuesta y es reconocida por el TCR (Garboczi *et al.* 1996). Tercero, a continuación de los residuos idénticos ubicados en la región central hay dos diferencias conservativas en las posiciones 8 y 9, que comprenden los residuos alifáticos Val e Ile en el ligando bacteriano, e Ile y Met en el péptido homólogo humano.

Se efectuó una búsqueda análoga para examinar la homología del péptido bacteriano **PqqC(70-78): ARKLLLDNL** con secuencias de proteínas humanas (**Tabla 2**). De nuevo, se encontró una alta homología con los residuos 172-180 del receptor humano de exportación nuclear exportina 6: **Exp6** (SwissProt n° Q96QU8). Como en el caso anterior, la secuencia **Exp6(172-180): LRKLLLDQV** posee seis de un total de nueve residuos (66.7%) idénticos a los del péptido bacteriano, incluyendo el residuo de anclaje principal Arg en p2, el residuo de anclaje secundario Lys en p3 e identidad en toda la región central del péptido (residuos 4-7 Leu, Leu, Leu, Asp). Además, las dos secuencias muestran residuos alifáticos en las posiciones de anclaje p1 (Ala y Leu, respectivamente) y p9 (Leu y Val, respectivamente), y poseen residuos polares en p8, posición accesible al TCR (Asn y Gln, respectivamente).

Estos resultados indican que dos ligandos de HLA-B27 de *Chlamydia trachomatis* procesados de manera endógena poseen una alta homología con secuencias de proteínas humanas que contienen los motivos de unión favorables a HLA-B27 y que, también tienen características que podrían favorecer una reacción inmunológica cruzada entre los péptidos bacterianos y los péptidos humanos, si éstos se presentan *in vivo* como ligandos naturales de HLA-B27.

*Discusión*





## Discusión

En la presente tesis se plantearon tres objetivos: 1) desarrollar un sistema para identificar péptidos de *Chlamydia trachomatis* que son procesados y presentados *in vivo* por HLA-B27, 2) analizar el posible mimetismo molecular entre ligandos endógenos derivados de la **DNA primasa** bacteriana y ligandos derivados de proteínas humanas y 3) estudiar si los epítomos de CTLs de las proteínas **NQRA** y **PqqC** de *Chlamydia trachomatis*, identificados mediante algoritmos predictivos, son procesados endógenamente y se presentan por HLA-B27. La discusión se ha organizado en concordancia con cada uno de los objetivos, finalizando con una discusión general.

### D.1.1 Alcance y limitaciones del sistema experimental

En la actualidad se desconoce qué proteínas de *Chlamydia trachomatis* y por qué mecanismo pueden alcanzar la vía de procesamiento y presentación de MHC de Clase I. Nuestra aproximación, implica la expresión endógena de proteínas bacterianas en células humanas HLA-B27 positivas. La aplicación de este sistema experimental nos ha permitido identificar varios ligandos de *Chlamydia trachomatis* derivados de las proteínas bacterianas transfectadas, los cuales se procesan y se presentan *in vivo* por HLA-B27, (Cragnolini and Lopez de Castro. 2008; Cragnolini *et al.* 2009). Sin embargo, se deben considerar varios aspectos. Primero, ¿es nuestra aproximación una alternativa apropiada a la identificación directa de ligandos de *Chlamydia trachomatis* en células infectadas?. Segundo, ¿alcanzarían las proteínas analizadas la vía de procesamiento y presentación de MHC de Clase I en una infección natural?. Tercero, dado que la sensibilidad de una célula T es mayor que el límite de sensibilidad de las técnicas de MS actuales: ¿es nuestra aproximación suficientemente sensible para detectar ligandos bacterianos y epítomos de CTLs presentados por HLA-B27?.

Los dos primeros interrogantes deben abordarse teniendo en cuenta el mecanismo de *cross*-presentación antigénica (Lin *et al.* 2008b). Las células dendríticas endocitan cuerpos apoptóticos y restos celulares de la célula infectada. Tras su captación, las proteínas bacterianas situadas en el compartimiento endosomal de la célula presentadora de antígeno se pueden transferir al citosol por un mecanismo caracterizado parcialmente, que involucra la participación del translocón sec61 (Ackerman *et al.* 2006). De esta manera, las proteínas bacterianas se incorporarían a la vía de degradación ubiquitina-proteasoma. En principio, cualquier proteína bacteriana que alcance esta vía, puede ser procesada de manera similar a cualquier proteína endógena. No obstante, otras vías independientes de proteasoma pueden contribuir como fuentes potenciales de antígenos, dentro de las cuales podemos citar la fusión de los endosomas con el RE, o el procesamiento en el compartimiento endosomal, seguido del intercambio

peptídico por moléculas de MHC de Clase I durante el reciclamiento entre este compartimiento y la superficie celular. Sin embargo, la contribución de estos mecanismos alternativos a la presentación de ligandos de MHC de Clase I, se desconoce (Lin *et al.* 2008a). En consecuencia, podemos afirmar que, en general, la producción de ligandos de HLA-B27 derivados del procesamiento de las proteínas bacterianas sintetizadas de manera endógena, tal y como contempla nuestro sistema experimental, es similar al procesamiento que tendría lugar en el citosol de las células presentadoras de antígeno profesionales, tras una infección. Los candidatos obvios en alcanzar la vía de procesamiento y presentación de MHC de Clase I en células infectadas con *Chlamydia trachomatis*, son las proteínas secretadas al citoplasma (Kleba and Stephens. 2008), además de otras, como por ejemplo las proteínas de la vacuola bacteriana, las cuales podrían tener acceso a este compartimento celular (Fling *et al.* 2001; Starnbach *et al.* 2003). Otras proteínas de *Chlamydia trachomatis* podrían alcanzar el citosol por mecanismos de *cross*-presentación aún no caracterizados.

Otra cuestión metodológica reside en la sensibilidad de las técnicas de MS empleadas en esta tesis, en comparación con la extrema sensibilidad de una célula T activada. En nuestras condiciones experimentales, el límite de detección de los ligandos de HLA-B27 se estimó en aproximadamente 100-200 copias por célula. Por otra parte, la sensibilidad de los CTLs se ha estimado en sólo unas copias de péptido por célula (Sykulev *et al.* 1996; Purbhoo *et al.* 2004). Por tanto, nuestra estrategia dista entre uno y dos órdenes de magnitud del límite de detección de una célula T. Sin embargo, la aproximación utilizada provee a la vía de degradación citosólica una cantidad relativamente grande de proteína bacteriana, mucho mayor que una infección natural. Es razonable asumir entonces, que la presentación de péptidos provenientes de la síntesis endógena de la proteína bacteriana, tras su transfección estable, tiene un rendimiento muy superior al número de copias de péptido presentado por HLA-B27 en células infectadas. De esta forma, nuestro modelo experimental permitiría la detección de péptidos que se presentarían en muy baja cantidad en una infección natural. Por esta razón, un péptido bacteriano no detectado en el repertorio peptídico unido a HLA-B27 en nuestro sistema experimental, probablemente no se presentaría en células infectadas con *Chlamydia trachomatis*. Sin embargo, no se puede descartar formalmente esta posibilidad sólo por criterios bioquímicos.

Como se ha comentado en la Introducción, se deben considerar otras cuestiones metodológicas importantes. El análisis directo de los péptidos presentados por HLA-B27 por MS en células infectadas puede resultar impracticable, debido a la muy baja expresión de antígenos bacterianos en estas células (Ramos *et al.* 2001; Ringrose *et al.* 2004). Además, los requerimientos edilicios de bioseguridad para trabajar a gran escala con *Chlamydia trachomatis*, actualmente son de muy difícil disponibilidad.

Finalmente, *Chlamydia trachomatis* disminuye rápidamente los niveles de MHC de Clase I en la superficie de la célula infectada (Zhong *et al.* 2000; Zhong *et al.* 2001). En la aproximación alternativa utilizada en esta tesis, existe una limitación inherente a la técnica de comparación del repertorio peptídico de HLA-B27. Si un péptido de *Chlamydia trachomatis* tiene el mismo tiempo de retención y la misma masa molecular que un ligando propio del repertorio constitutivo de HLA-B27, este no se reflejará como una señal peptídica diferencial. Por esta razón, no descartamos la posibilidad de que puedan existir péptidos adicionales presentados por HLA-B27, además de los ligandos descritos, que hubieran pasado inadvertidos en las comparaciones de los repertorios peptídicos. Por otra parte, el hallazgo de un ligando expresado diferencialmente en el transfectante estable de la **PqqC** pero procedente de una proteína humana, indica que la detección de un ión diferencial en nuestro sistema experimental, no necesariamente corresponde a un péptido bacteriano. Para asignar apropiadamente una señal diferencial como un péptido bacteriano específico, es fundamental determinar su secuencia de aminoácidos.

### D.1.2 Identificación de ligandos de la DNA primasa de *Chlamydia trachomatis* presentados *in vivo* por HLA-B27

El segundo objetivo de esta tesis consistió en examinar el posible mimetismo molecular entre ligandos presentados por HLA-B27 derivados de la **DNA primasa** y ligandos naturales presentes en el repertorio constitutivo de B27. La justificación de esta búsqueda, como se ha comentado, fue el hallazgo en nuestro laboratorio de un péptido perteneciente a los residuos 309-320 derivado del procesamiento de la región intracitoplasmática de HLA-B27 y de otras moléculas de MHC de Clase I (RRKSSGGKGGSY), el cual es un ligando natural de tres subtipos asociados a EA. Este péptido posee una alta homología con los residuos 211-222 de la **DNA primasa** de *Chlamydia trachomatis* (RRFKEGGRGGKY). El péptido bacteriano, **P(211-222)**, se une *in vitro* a HLA-B27, y se genera directamente por el proteasoma a partir de un precursor sintético (Ramos *et al.* 2002a). Más aún, las formas persistentes de *Chlamydia trachomatis*, las cuales promueven la cronicidad de la infección y están presentes en los sitios de inflamación de pacientes con ReA inducida por este patógeno, permanecen metabólicamente activas durante la replicación del DNA (Gerard *et al.* 2001). En consecuencia, la **DNA primasa** podría estar siendo activamente sintetizada en las formas persistentes de la bacteria, siendo una fuente potencial de antígenos bacterianos en la enfermedad crónica.

En nuestra aproximación inicial para expresar directamente la **DNA primasa**, nos encontramos con dos problemas. Primero, la transfección directa del gen bacteriano resultó en una transcripción

activa de éste, pero no se observó evidencia de una traducción significativa de la proteína. Presumiblemente, este hecho se debe a la baja compatibilidad de las secuencias de RNA bacteriano con la maquinaria de traducción eucariota. Para sortear este problema, y monitorizar la expresión de la **DNA primasa** bacteriana, se fusionó esta proteína al extremo C-terminal de la *GFP*. Aunque, la proteína de fusión completa se expresó eficientemente en experimentos de transfección transitoria, no se obtuvieron transfectantes estables en la línea celular C1R-B\*2705. La expresión de la proteína bacteriana podría interferir con la replicación de DNA humano, compitiendo con la DNA primasa humana por la unión al DNA, además de otros efectos bloqueantes. Por tanto, se diseñaron proteínas de fusión alternativas en donde se escindió el dominio de unión a DNA, **P(90-595)**, o éste y el dominio de interacción con la helicasa, **P(90-450)**. La secuencia **P(211-222)**, homóloga al ligando natural de HLA-B27, se localiza en el dominio central TOPRIM de la molécula. Ambas construcciones se expresaron de manera estable en C1R-B\*2705. Sin embargo, debido a que los niveles de expresión de la construcción más corta fueron mayores a los niveles de **P(90-595)** observados, se eligió **P(90-450)** para la subsiguiente caracterización de ligandos bacterianos de HLA-B27.

Los hallazgos principales de este estudio son los siguientes. Primero, el péptido **P(211-222)**, no se produce por el procesamiento endógeno de la proteína bacteriana en células C1R, al menos en los niveles de detección alcanzados en este estudio. Segundo, el péptido relacionado **P(211-221)** RRFKEGGRGGK se procesó de manera endógena y se presentó por B\*2705. No podemos descartar la posibilidad de que **P(211-222)**, u otros péptidos relacionados, **P(211-218)** ó **P(211-223)**, pudieran ser producidos y presentados por HLA-B27 en cantidades muy bajas. La presentación endógena de **P(211-221)** es consistente con la posibilidad de que esta secuencia de la **DNA primasa** pudiera ser un mediador de mimetismo molecular entre *Chlamydia trachomatis* y el ligando de HLA-B27 homólogo, siendo relevante en la ReA asociada a HLA-B27. Esta cuestión está siendo actualmente analizada por cristalografía comparativa de HLA-B27 en complejo con **B27(309-320)** y **P(211-221)** (Kumar *et al.* Datos no publicados).

El procesamiento endógeno y la presentación del péptido **P(211-221)**, pero no de otros péptidos relacionados, tiene dos aspectos notables. Primero, en digestiones *in vitro* del precursor sintético **P(203-230)** con proteasoma 20S purificado se observó, el corte después del residuo Tyr 222, y más eficientemente tras el residuo Ile 223, pero no tras el residuo Lys 221 (Ramos *et al.* 2002a). En consecuencia, contrariamente a otros ejemplos descritos (Kessler *et al.* 2001; Alvarez *et al.* 2001b), el patrón de digestión proteasómico *in vitro* de la correspondiente proteína, no concuerda con el procesamiento endógeno observado. Segundo, es poco probable que el péptido **P(211-221)** se presente

por otros subtipos asociados a enfermedad, tales como B\*2702, B\*2704 y B\*2707, debido a que su residuo C-terminal Lys no es idóneo para estos subtipos (Lopez de Castro *et al.* 2004; Gomez *et al.* 2006). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que péptidos relacionados, que tengan residuos de anclaje adecuados, particularmente el péptido **P(211-223)** el cual posee un residuo C-terminal alifático, puedan ser presentados por estos subtipos.

El segundo hallazgo de este estudio fue, la identificación de dos péptidos bacterianos adicionales y estrechamente relacionados entre sí, **P(112-121): RRINREAERF** y **P(112-122): RRINREAERFF**, que son presentados por HLA-B27 tras su procesamiento endógeno. Aunque la secuencia peptídica RRINREAER, incluye los motivos de unión principales a HLA-B27, este péptido **P(112-120)**, no se detectó en el *pool* unido a HLA-B27. No se tiene constancia de ningún ligando natural de B27 que posea a la vez un residuo básico en la posición C-terminal ( $p\Omega$ ) y un residuo ácido en la  $p\Omega-1$ . Sin embargo, es relativamente frecuente observar un residuo ácido en la  $p\Omega-1$ , seguido de un residuo alifático o aromático en la  $p\Omega$  (Lopez de Castro *et al.* 2004). Una explicación plausible a este hecho, puede ser que la presencia del residuo Glu inmediatamente antes del residuo C-terminal de Arg puede disminuir la eficiencia de corte tras el residuo Arg120. Es bien conocido que los residuos ácidos adyacentes pueden reducir la actividad tróptica del proteasoma tras residuos básicos (Unno *et al.* 2002). Sin embargo, se han descrito en alotipos de HLA-A, múltiples ligandos naturales con residuos ácidos seguidos de residuos básicos C-terminales (Seeger *et al.* 1999; Weinschenk *et al.* 2002; Kruger *et al.* 2005). Por tanto, es posible que la ausencia de este motivo en los ligandos naturales de B27 no este relacionado con características de procesamiento antigénico, sino más bien con restricciones de unión a HLA-B27.

La observación de que múltiples secuencias humanas mostraron una alta homología con **P(112-121)** y **P(112-122)** sugiere que en el repertorio de B27 podrían existir uno o más ligandos con el potencial de exhibir mimetismo molecular con los péptidos bacterianos. Esta posibilidad se puede abordar realizando una búsqueda específica de los péptidos correspondientes en el *pool* constitutivo unido a HLA-B27. En este estudio, no se indagó en esa dirección.

El rendimiento relativamente alto de **P(112-121)** nos permitió determinar, mediante el marcaje isotópico estable con Arg pesada e inhibición del proteasoma, que la proteína de fusión P(90-450) se procesa por la vía proteasómica. No se pudo determinar la dependencia de proteasoma de **P(112-122)** y **P(211-221)**, debido al bajo rendimiento de estos péptidos. No obstante, en un estudio previo donde se utilizó el mismo método, para examinar la dependencia de proteasoma de los ligandos de B\*2705,

múltiples péptidos derivados de la misma proteína parental mostraron, de manera consistente, el mismo patrón de sensibilidad o insensibilidad frente a los inhibidores de proteasoma (Marcilla *et al.* 2007).

En su conjunto, los estudios relativos a la **DNA primasa** de *Chlamydia trachomatis* validan la aproximación utilizada, al demostrar que la expresión estable de proteínas de fusión bacterianas, seguido del análisis inmunoproteómico comparativo de los repertorios peptídicos, permite la identificación directa de ligandos bacterianos de HLA-B27 procesados endógenamente.

### **D.1.3 Identificación de ligandos de las proteínas NQRA y PqqC de *Chlamydia trachomatis* presentados *in vivo* por HLA-B27**

Existen al menos dos razones por las cuales, el análisis del reconocimiento de epítomos específicos de B27 de *Chlamydia trachomatis* por CTLs es importante en el estudio de la patogenia de las espondiloartropatías. Primero, las células T activadas pueden favorecer la inducción hacia las formas persistentes de la bacteria a través de la producción de INF- $\gamma$  (Brunham and Rey-Ladino. 2005), lo cual constituye un evento crucial en el establecimiento de la infección crónica. Segundo, debido al mimetismo molecular entre los péptidos propios y los péptidos bacterianos presentados por HLA-B27, se podría generar una reacción cruzada, produciendo daño tisular y autoinmunidad en los tejidos diana (Benjamin and Parham. 1990; Bachmaier *et al.* 1999; Bachmaier and Penninger. 2005).

A partir de un análisis sistemático del proteoma bacteriano basado en algoritmos predictivos, se describió una serie de ligandos de *Chlamydia trachomatis* capaces de unirse a HLA-B27, y ser reconocidos por CTLs de pacientes con ReA inducida por esta bacteria (Kuon *et al.* 2001; Appel *et al.* 2004). La descripción de estos ligandos, supuso un avance significativo en la definición de la naturaleza de las respuestas de CTLs específicas de B27 en la ReA. No obstante, esta aproximación tiene varias limitaciones, de las cuales la principal se debe a la naturaleza intrínseca de los CTLs de reaccionar cruzadamente (Wucherpfennig and Strominger. 1995; Evavold *et al.* 1995). En consecuencia, un péptido sintético reconocido *in vitro* por un CTL activado, puede no estar relacionado con el epítomo natural responsable de la activación de los CTLs *in vivo*. Además, los algoritmos utilizados para seleccionar los epítomos de células T de *Chlamydia trachomatis* están basados en parámetros no totalmente precisos. Por ejemplo, existe una correspondencia sólo parcial entre el procesamiento proteasómico *in vivo* y los patrones de corte con proteasoma 20S *in vitro* (Rock and Goldberg. 1999), y un insuficiente refinamiento de los motivos de unión a MHC de Clase I (Ruppert *et al.* 1993). Por último, debido a razones prácticas, la búsqueda de epítomos potenciales en el proteoma de *Chlamydia trachomatis* mediante herramientas informáticas, se limitó únicamente a nonámeros. Sin embargo, un

porcentaje significativo de los ligandos presentados por HLA-B27 corresponden a péptidos más largos (Lopez de Castro *et al.* 2004). En consecuencia, para validar la relevancia de los epítomos de células T descritos, tanto en la respuesta inmune frente a *Chlamydia trachomatis* como en la ReA, se debe demostrar en estos péptidos, su procesamiento endógeno y presentación *in vivo* por HLA-B27.

Mediante la expresión estable de las proteínas bacterianas estudiadas en células humanas B27 positivas y la subsiguiente identificación directa por MS de los correspondientes ligandos de HLA-B27, se detectaron dos péptidos bacterianos específicos procedentes de las proteínas **NQRA** y **PqqC**, correspondientes a los residuos 86-94 y 70-78, respectivamente. Nuestros resultados demuestran tanto el alcance como las limitaciones de los algoritmos de predicción de epítomos empleados a partir del proteoma de *Chlamydia trachomatis*. Así, dichos algoritmos predijeron correctamente un epítomo procesado naturalmente, como es el péptido **PqqC(70-78)**: ARKLLLDNL. Sin embargo, no identificaron un segundo ligando endógeno de HLA-B27, como es el péptido **NQRA(86-94)**: KRALLEIVI. Por otra parte, al menos uno de los epítomos predichos, **NQRA(330-338)**, aparentemente no se procesa *in vivo*. Notablemente, este péptido mostró una baja eficiencia en la inducción del plegamiento de HLA-B27 *in vitro* (Kuon *et al.* 2001), lo cual sugiere que éste es un ligando de HLA-B27 de baja afinidad. En consecuencia, para la búsqueda de antígenos procesados de manera endógena, los algoritmos de predicción de epítomos de células T son únicamente orientativos. Cualquier epítomo potencial de células T, aún cuando sean reconocidos por CTLs *in vitro*, deben confirmarse mediante experimentos de procesamiento y presentación endógeno del antígeno candidato, utilizando la detección directa por MS, como se hizo en este estudio, mediante el reconocimiento por CTLs en células que expresen la proteína parental, o mediante ambas estrategias.

En consecuencia, el péptido **PqqC(70-78)** es el primer epítomo conocido de *Chlamydia trachomatis* específico de B27 implicado en la ReA, que es procesado de manera endógena y presentado *in vivo* por HLA-B27.

La alta homología de **NQRA(86-94)** y **PqqC(70-78)** con secuencias del proteoma humano, que incluye identidad o gran similitud tanto en residuos de anclaje como en los residuos reconocidos por el TCR, se suma a la homología similar descrita en los ligandos derivados de la **DNA primasa** de *Chlamydia trachomatis*, estudiadas en la sección anterior. El nivel de homología observado entre secuencias bacterianas cortas y proteínas humanas es relativamente frecuente y en general, no está restringido a estos ejemplos en particular (Davies. 2000). Sin embargo, estas homologías indican que hay múltiples posibilidades para la generación de ligandos de HLA-B27 propios que posean mimetismo molecular con epítomos de *Chlamydia trachomatis* procesados endógenamente. En este estudio, no se

examinaron ni el procesamiento, ni la presentación por HLA-B27 de estos péptidos, los cuales merecen un estudio pormenorizado. Necesariamente, nuestra aproximación para el estudio del mimetismo molecular entre ligandos de HLA-B27 está restringida únicamente al análisis de la homología de secuencias de los péptidos analizados, aunque la reactividad cruzada de las células T puede ocurrir entre péptidos que posean una homología de secuencia no detectable (Wucherpennig and Strominger. 1995; Evavold *et al.* 1995; Wucherpennig. 2005; Blank *et al.* 2007), lo cual añade un aspecto adicional de dificultad cuyo estudio es mucho más difícil y requiere estrategias alternativas de análisis.

La detección de un ligando no bacteriano diferencialmente expresado en el transfectante estable de la **PqqC**, pone de manifiesto, que para asignar de manera adecuada una señal diferencial como un péptido bacteriano específico, es necesario determinar su secuencia de aminoácidos mediante análisis MS/MS. No conocemos la razón para explicar la expresión diferencial de un péptido propio en un transfectante estable de una proteína de *Chlamydia trachomatis*. Existen al menos tres posibilidades. Primero, que sea un péptido compartido, detectado por azar en el transfectante de la **PqqC**, y no en los otros transfectantes analizados. Segundo, que la proteína parental **ASB2** del péptido detectado, se sobreexpresara por azar en el transfectante seleccionado en este estudio. Tercero, que la sobreexpresión de **ASB2** pueda haber ocurrido como consecuencia de la expresión de la proteína de fusión bacteriana **GFP-PqqC**. Consideramos la primera posibilidad poco probable, debido a que el ión diferencial fue observado en el mismo transfectante, pero no en ninguna otra célula transfectante empleada, en dos experimentos independientes. No descartamos la segunda posibilidad, ya que ello requeriría la generación de un nuevo transfectante de la **PqqC**, que no se realizó. La tercera posibilidad sería consistente con que la expresión de **GFP-PqqC** regulara positivamente ciertos componentes de la vía ubiquitina-proteasoma de degradación de proteínas, a la cual pertenece la proteína **ASB2**. No se investigó esta cuestión ya que no está relacionada con los objetivos de esta tesis.

## D.2 Resumen de los hallazgos principales

El empleo de nuestro sistema experimental para buscar ligandos de la **DNA primasa** de *Chlamydia trachomatis* presentados por HLA-B27 nos permitió identificar tres péptidos bacterianos. **P(112-121)**, **P(112-122)** y **P(211-221)**, son los primeros péptidos de *Chlamydia trachomatis* descritos como ligandos naturales de HLA-B27 producidos por el procesamiento endógeno de la proteína parental bacteriana. **P(211-221)** posee una alta homología con un ligando natural del repertorio constitutivo de HLA-B27 (Ramos *et al.* 2002a). **P(112-121)** y **P(112-122)** muestran alta homología



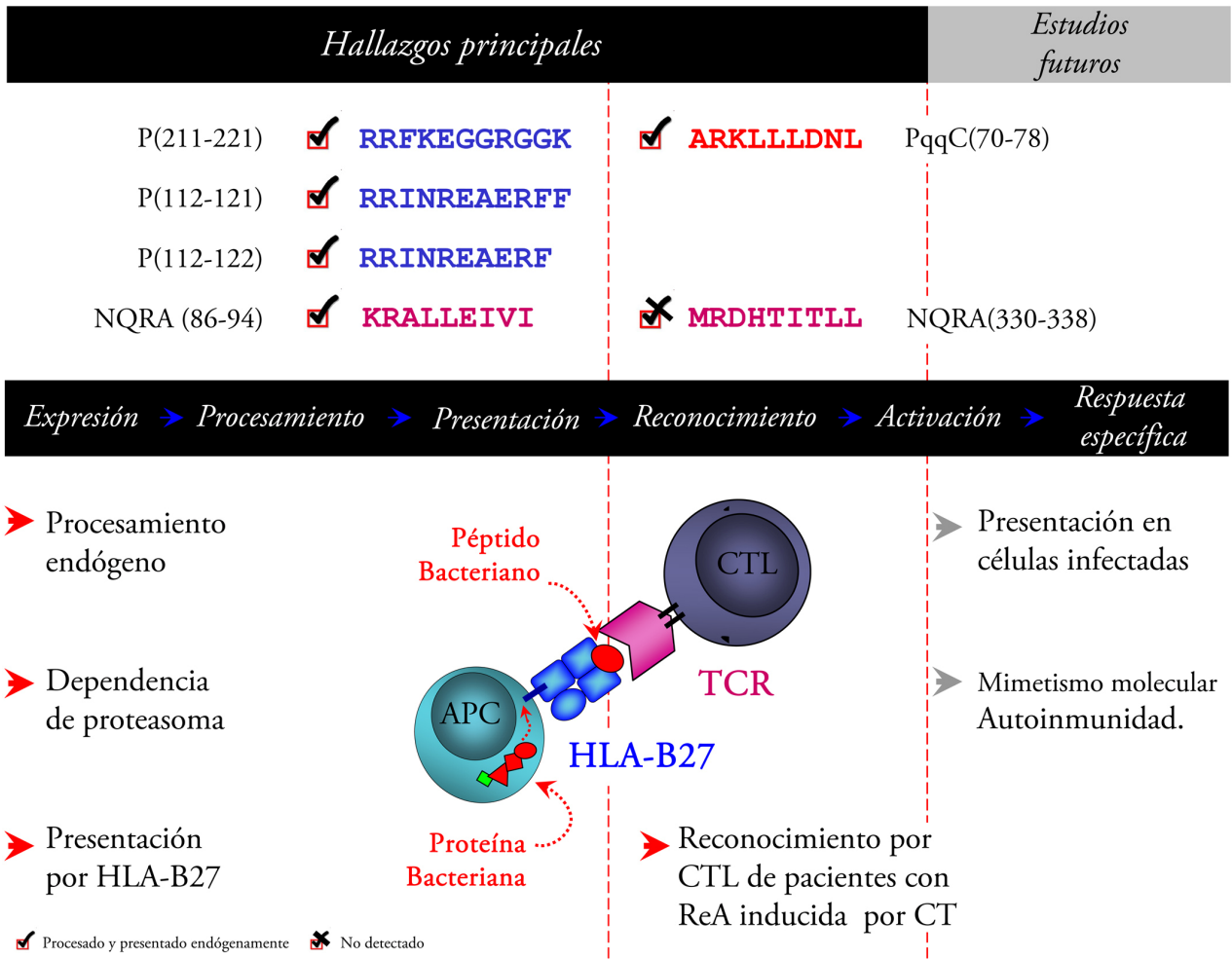
con múltiples secuencias del proteoma humano que contienen los motivos de unión a HLA-B27. Por tanto, el análisis del procesamiento endógeno de ligandos de HLA-B27 derivados de la **DNA primasa** de *Chlamydia trachomatis* es compatible con un mecanismo patogénico de ReA basado en el mimetismo molecular.

En la ejecución de nuestro tercer objetivo, hemos demostrado por primera vez el procesamiento y presentación endógenos de un epítipo de células T reconocido por CTLs de pacientes con ReA, **PqqC(70-78)**. Sin embargo, no se confirmó la generación endógena de un segundo epítipo descrito mediante algoritmos predictivos y ensayos de reconocimiento *in vitro* por CTLs, **NQRA(330-338)**. Por otra parte, identificamos un nonúmero no relacionado, **NQRA(86-94)**, derivado de la misma proteína parental, que se procesa y presenta *in vivo* por HLA-B27, y que no fue detectado por los algoritmos predictivos. Estos resultados subrayan las limitaciones inherentes a los métodos informáticos de predicción, para identificar ligandos naturales de MHC de Clase I y epítopos naturales de células T. La similitud observada entre **NQRA(86-94)** y **PqqC(70-78)** con secuencias del proteoma humano que poseen residuos compatibles con la unión a HLA-B27, se suma a los hallazgos análogos con la **DNA primasa** y proporcionan una base bioquímica al mimetismo molecular entre péptidos de *Chlamydia trachomatis* y péptidos propios presentados por HLA-B27, con potencial patogénico en espondiloartritis.

En conclusión, el sistema experimental desarrollado y utilizado en esta tesis es válido para determinar péptidos de *Chlamydia trachomatis* procesados y presentados de manera endógena por HLA-B27 en células humanas. En su aplicación a las proteínas **DNA primasa**, **NQRA** y **PqqC**, se han identificado 5 ligandos bacterianos de HLA-B27 incluyendo: 1) un péptido que posee alta homología con un ligando natural propio de HLA-B27, 2) La descripción del primer epítipo específico de HLA-B27 procesado de manera endógena que está implicado en las respuestas de CTLs contra *Chlamydia trachomatis* en pacientes con ReA, 3) tres ligandos adicionales, que presentan una alta homología con múltiples secuencias de proteínas humanas con características estructurales propias de los ligandos de HLA-B27. La identificación de todos éstos péptidos valida esta técnica para la búsqueda y mapeo de epítopos bacterianos específicos presentados por HLA-B27 con posible relevancia en la patogénesis de la ReA (**Figura 31**).

Los resultados de esta tesis proporcionan una base para abordar la identificación directa de péptidos bacterianos en el repertorio peptídico de HLA-B27 en células infectadas con *Chlamydia trachomatis*. Por ejemplo, podría intentarse la búsqueda directa por MS de los péptidos caracterizados en esta tesis, u otros identificados de manera similar, en base a su masa molecular, características

cromatográficas y patrones de fragmentación. Adicionalmente, se pueden utilizar los transfectantes generados en este proyecto, como células diana de experimentos utilizando CTLs de pacientes con ReA



**Figura 31. Hallazgos principales y estudios futuros: resumen.** En el panel superior, se muestran los ligandos de HLA-B27 y el epítipo de células T identificados en esta tesis doctoral. Se demostró el procesamiento endógeno y la presentación *in vivo* por HLA-B27 de 5 péptidos bacterianos, los cuales podrían jugar algún papel en la patogenia de la artritis reactiva inducida por *Chlamydia trachomatis*. Estudios futuros podrían emplear los transfectantes generados en esta tesis, u otros análogos, para ensayos funcionales de reactividad de CTLs y mimetismo molecular, y los péptidos identificados para confirmar su presentación en células infectadas.

inducida por *Chlamydia trachomatis*. Nuestros resultados son consistentes con la existencia de un mecanismo autoinmune de inducción de ReA, debido a la reacción cruzada entre CTLs específicos de *Chlamydia trachomatis* y presentados por HLA-B27, con ligandos propios presentados por esta molécula. Sin embargo, para probar la significación de los péptidos identificados en este estudio, u otros péptidos aún por identificar, es imprescindible demostrar fehacientemente que estos epítopos juegan un papel determinante en la patogenia de la ReA, una cuestión aún no resuelta.

*Conclusiones*



## Conclusiones

- 1.- La expresión de proteínas de fusión de *Chlamydia trachomatis* en células humanas B27 positivas, en combinación con el análisis comparativo directo de los repertorios peptídicos de HLA-B27 mediante espectrometría de masas, es un método eficaz para el análisis del procesamiento y presentación endógenos de péptidos bacterianos por HLA-B27.
- 2.- El péptido P(211-221) de la **DNA primasa** de *Chlamydia trachomatis*, homólogo al ligando de HLA-B27(309-320) se procesa endógenamente y es presentado por HLA-B27 en células humanas que expresan la proteína de fusión P(90-450). Este péptido podría ser un mediador de mimetismo molecular con un ligando propio de HLA-B27. La versión extendida P(211-222), no se produce por el procesamiento endógeno de la proteína bacteriana en células humanas.
- 3.- Los péptidos P(112-121) y P(112-122) de la **DNA primasa** de *Chlamydia trachomatis* son procesados y presentados *in vivo* por HLA-B27. La alta homología de secuencia entre estos péptidos y secuencias de proteínas humanas con motivos de unión a HLA-B27, es compatible con la posibilidad de mimetismo antigénico con péptidos propios.
- 4.- La **DNA primasa** de *Chlamydia trachomatis* se procesa de manera dependiente de proteasoma.
- 5.- El nonámero NQRA(86-94), que no fue detectado mediante algoritmos predictivos, es procesado endógenamente y es presentado por HLA-B27 *in vivo*.
- 6.- La generación endógena del epítipo NQRA(330-338) descrito mediante algoritmos predictivos y ensayos de reconocimiento *in vitro* de CTLs , no se confirmó.
- 7.- Por tanto, la predicción de ligandos y epítopos de HLA-B27 mediante algoritmos teóricos es imprecisa. Estos métodos deben usarse únicamente como una aproximación inicial. Los ligandos y epítopos predichos deben confirmarse con experimentos donde se demuestre su procesamiento y presentación *in vivo*.
- 8.- Se demostró el procesamiento y presentación endógenos de un epítipo de células T reconocido por CTLs de pacientes con ReA, PqqC(70-78). Éste constituye el primer epítipo endógeno de CTLs

presentado por HLA-B27 que participa en la respuesta inmune contra *Chlamydia trachomatis* en pacientes con ReA.

9.- Todos los ligandos endógenos de *Chlamydia trachomatis* identificados en este estudio, presentan una homología significativa con secuencias de proteínas humanas que contienen las características estructurales propias de HLA-B27. Este resultado refleja la alta frecuencia con que ligandos bacterianos podrían presentar mimetismo molecular con ligandos propios de HLA-B27 y provee una base bioquímica para posibles reacciones cruzadas que podrían generar autoinmunidad.

10.- Nuestros resultados son consistentes con la existencia de un mecanismo autoinmune de inducción de ReA, debido a la reacción cruzada entre CTLs específicos de *Chlamydia trachomatis* y restringidos por HLA-B27 con ligandos propios presentados por esta molécula, de acuerdo con la hipótesis del péptido artrítico para la patogenia de las espondiloartropatías.

## *Referencias*





## Referencias

- Abdelrahman, Y.M., and R.J. Belland. 2005. The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiol Rev.* 29:949-59.
- Ackerman, A.L., A. Giodini, and P. Cresswell. 2006. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity.* 25:607-17.
- Albert, L.J., and R.D. Inman. 1999. Molecular mimicry and autoimmunity. *N Engl J Med.* 341:2068-74.
- Alvarez, I., M. Martı́, J. Vazquez, E. Camafeita, S. Ogueta, and J.A. Lopez de Castro. 2001a. The Cys-67 residue of HLA-B27 influences cell surface stability, peptide specificity, and T-cell antigen presentation. *J.Biol.Chem.* 276:48740-48747.
- Alvarez, I., L. Sesma, M. Marcilla, M. Ramos, M. Martı́, E. Camafeita, and J.A. Lopez de Castro. 2001b. Identification of Novel HLA-B27 Ligands Derived from Polymorphic Regions of its own or Other Class I Molecules Based on Direct Generation by 20S Proteasome. *J.Biol.Chem.* 276:32729-32737.
- Allen, R.L., C.A. O'Callaghan, A.J. McMichael, and P. Bowness. 1999. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel  $\alpha 2$ -microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J.Immunol.* 162:5045-5048.
- Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science.* 181:223-30.
- Ang, C.W., B.C. Jacobs, and J.D. Laman. 2004. The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol.* 25:61-6.
- Anttonen, K., A. Orpana, M. Leirisalo-Repo, and H. Repo. 2006. Aberrant TNF secretion by whole blood in healthy subjects with a history of reactive arthritis: time course in adherent and non-adherent cultures. *Ann Rheum Dis.* 65:372-8.
- Appel, H., L. Gauthier, J. Pyrdol, and K.W. Wucherpfennig. 2000. Kinetics of T-cell receptor binding by bivalent HLA-DR.Peptide complexes that activate antigen-specific human T-cells. *J Biol Chem.* 275:312-21.
- Appel, H., W. Kuon, M. Kuhne, P. Wu, S. Kuhlmann, S. Kollnberger, A. Thiel, P. Bowness, and J. Sieper. 2004. Use of HLA-B27 tetramers to identify low-frequency antigen-specific T cells in Chlamydia-triggered reactive arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 6:R521-R534.
- Arstila, T.P., A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky. 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science.* 286:958-61.
- Bachmaier, K., N. Neu, L.M. de la Maza, S. Pal, A. Hessel, and J.M. Penninger. 1999. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science.* 283:1335-1339.
- Bachmaier, K., and J.M. Penninger. 2005. Chlamydia and antigenic mimicry. *Curr Top Microbiol Immunol.* 296:153-63.
- Bannantine, J.P., R.S. Griffiths, W. Viratyosin, W.J. Brown, and D.D. Rockey. 2000. A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell Microbiol.* 2:35-47.
- Barnstable, C.J., W.F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A.F. Williams, and A. Ziegler. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetic analysis. *Cell.* 14:9-20.
- Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R.D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon, E.L. Sonnhammer, D.J. Studholme, C. Yeats, and S.R. Eddy. 2004. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 32:D138-41.
- Beatty, P.R., and R.S. Stephens. 1994. CD8+ T lymphocyte-mediated lysis of Chlamydia-infected L cells using an endogenous antigen pathway. *J Immunol.* 153:4588-95.
- Beatty, W.L., T.A. Belanger, A.A. Desai, R.P. Morrison, and G.I. Byrne. 1994a. Role of

- tryptophan in gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Ann N Y Acad Sci.* 730:304-6.
- Beatty, W.L., T.A. Belanger, A.A. Desai, R.P. Morrison, and G.I. Byrne. 1994b. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun.* 62:3705-11.
- Beatty, W.L., G.I. Byrne, and R.P. Morrison. 1993. Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:3998-4002.
- Beatty, W.L., G.I. Byrne, and R.P. Morrison. 1994c. Repeated and persistent infection with *Chlamydia* and the development of chronic inflammation and disease. *Trends Microbiol.* 2:94-8.
- Beatty, W.L., R.P. Morrison, and G.I. Byrne. 1994d. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev.* 58:686-99.
- Belland, R.J., M.A. Scidmore, D.D. Crane, D.M. Hogan, W. Whitmire, G. McClarty, and H.D. Caldwell. 2001. *Chlamydia trachomatis* cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:13984-9.
- Benjamin, R., and P. Parham. 1990. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today.* 11:137-142.
- Benoist, C., and D. Mathis. 2001. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol.* 2:797-801.
- Bergerat, A., B. de Massy, D. Gadelle, P.C. Varoutas, A. Nicolas, and P. Forterre. 1997. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature.* 386:414-7.
- Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1987a. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature.* 329:512-518.
- Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1987b. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 329:506-512.
- Blank, M., O. Barzilai, and Y. Shoenfeld. 2007. Molecular mimicry and auto-immunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 32:111-8.
- Boes, B., H. Hengel, T. Ruppert, G. Multhaupt, U.H. Koszinowski, and P.M. Kloetzel. 1994. Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J.Exp.Med.* 179:901-909.
- Bouvier, M. 2003. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol Immunol.* 39:697-706.
- Bouvier, M., and D.C. Wiley. 1994. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science.* 265:398-402.
- Braun, J., and J. Sieper. 1999. Cytokines and the immunopathology of the spondyloarthropathies. *Curr Rheumatol Rep.* 1:67-77.
- Brewerton, D.A., M. Caffrey, A. Nicholls, D. Walters, J.K. Oates, and D.C. James. 1973a. Reiter's disease and HL-A 27. *Lancet.* 2:996-998.
- Brewerton, D.A., F.D. Hart, A. Nicholls, M. Caffrey, D.C. James, and R.D. Sturrock. 1973b. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet.* 1:904-907.
- Brunham, R.C., and J. Rey-Ladino. 2005. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nat Rev Immunol.* 5:149-61.
- Burmester, G.R., A. Daser, T. Kamradt, A. Krause, N.A. Mitchison, J. Sieper, and N. Wolf. 1995. Immunology of reactive arthritides. *Annu.Rev.Immunol.* 13:229-250.
- Burton, P.R., et al. 2007. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet.* 39:1329-37.
- Byrne, G.I., and D.M. Ojcius. 2004. *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2:802-8.

- Calvo, V., S. Rojo, D. Lopez, B. Galocha, and J.A. Lopez de Castro. 1990. Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism. *J.Immunol.* 144:4038-4045.
- Clifton, D.R., K.A. Fields, S.S. Grieshaber, C.A. Dooley, E.R. Fischer, D.J. Mead, R.A. Carabeo, and T. Hackstadt. 2004. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10166-71.
- Colbert, R.A. 2000a. HLA-B27 misfolding and spondyloarthropathies: not so groovy after all? *J.Rheumatol.* 27:1107-1109.
- Colbert, R.A. 2000b. HLA-B27 misfolding: a solution to the spondyloarthropathy conundrum? *Mol.Med.Today.* 6:224-230.
- Colmegna, I., R. Cuchacovich, and L.R. Espinoza. 2004. HLA-B27-associated reactive arthritis: pathogenetic and clinical considerations. *Clin Microbiol Rev.* 17:348-69.
- Cragolini, J.J., N. García-Medel, and J.A. López de Castro. 2009. Endogenous Processing and Presentation of T-cell Epitopes from Chlamydia trachomatis with Relevance in HLA-B27-associated Reactive Arthritis. *Submitted.*
- Cragolini, J.J., and J.A. Lopez de Castro. 2008. Identification of endogenously presented peptides from Chlamydia trachomatis with high homology to human proteins and to a natural self-ligand of HLA-B27. *Mol.Cell Proteomics.* 7:170-180.
- Cui, X., F. Hawari, S. Alsaaty, M. Lawrence, C.A. Combs, W. Geng, F.N. Rouhani, D. Miskinis, and S.J. Levine. 2002. Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding. *J.Clin.Invest.* 110:515-526.
- Cui, X., F.N. Rouhani, F. Hawari, and S.J. Levine. 2003a. An aminopeptidase, ARTS-1, is required for interleukin-6 receptor shedding. *J.Biol.Chem.* 278:28677-28685.
- Cui, X., F.N. Rouhani, F. Hawari, and S.J. Levine. 2003b. Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding. *J.Immunol.* 171:6814-6819.
- Chien, Y.H., and M.M. Davis. 1993. How alpha beta T-cell receptors 'see' peptide/MHC complexes. *Immunol Today.* 14:597-602.
- D'Amato, M., M.T. Fiorillo, C. Carcassi, A. Mathieu, A. Zuccarelli, P.P. Bitti, R. Tosi, and R. Sorrentino. 1995. Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur.J.Immunol.* 25:3199-3201.
- Damian, R.T. 1964. Molecular mimicry. *The Americal Journalist.* XCVIII.
- Daniel, S., V. Brusic, S. Caillat-Zucman, N. Petrovsky, L. Harrison, D. Riganelli, F. Sinigaglia, F. Gallazzi, J. Hammer, and P.M. Van Endert. 1998. Relationship between peptide selectivities of human transporters associated with antigen processing and HLA class I molecules. *J.Immunol.* 161:617-624.
- Davies, J.M. 2000. Introduction: Epitope mimicry as a component cause of autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci.* 57:523-6.
- Davis, M.M., and Y. Chien. 1993. Topology and affinity of T-cell receptor mediated recognition of peptide-MHC complexes. *Curr Opin Immunol.* 5:45-9.
- de la Salle, H., D. Hanau, D. Fricker, A. Urlacher, A. Kelly, J. Salamero, S.H. Powis, L. Donato, H. Bausinger, and M. Laforet. 1994. Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science.* 265:237-241.
- Deverson, E.V., I.R. Gow, W.J. Coadwell, J.J. Monaco, G.W. Butcher, and J.C. Howard. 1990. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature.* 348:738-41.
- Dick, L.R., C.R. Moomaw, G.N. DeMartino, and C.A. Slaughter. 1991. Degradation of oxidized insulin B chain by the multiproteinase complex macropain (proteasome). *Biochemistry.* 30:2725-2734.
- Dick, T.P., T. Ruppert, M. Groettrup, P.M. Kloetzel, L. Kuehn, U.H. Koszinowski, S. Stevanovic, H. Schild, and H.G. Rammensee. 1996. Coordinated dual

- cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell*. 86:253-262.
- Dong, G., P.A. Wearsch, D.R. Peaper, P. Cresswell, and K.M. Reinisch. 2009. Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity*. 30:21-32.
- Duchmann, R., E. May, B. Ackermann, B. Goergen, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and E. Marker-Hermann. 1996. HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to arthritogenic enterobacteria or self-antigens are dominated by closely related TCRBV gene segments. A study in patients with reactive arthritis. *Scandinavian journal of Immunology*. 43:101-108.
- Dulphy, N., M.A. Peyrat, V. Tieng, C. Douay, C. Rabian, R. Tamouza, S. Laoussadi, F. Berenbaum, A. Chabot, M. Bonneville, D. Charron, and A. Toubert. 1999. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J.Immunol*. 162:3830-3839.
- Edwards, J.C., P. Bowness, and J.R. Archer. 2000. Jekyll and Hyde: the transformation of HLA-B27. *Immunol.Today*. 21:256-260.
- Eggers, M., B. Boes-Fabian, T. Ruppert, P.M. Kloetzel, and U.H. Koszinowski. 1995. The cleavage preference of the proteasome governs the yield of antigenic peptides. *J.Exp.Med*. 182:1865-1870.
- Ellgaard, L., and A. Helenius. 2001. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol*. 13:431-7.
- Evavold, B.D., J. Sloan-Lancaster, K.J. Wilson, J.B. Rothbard, and P.M. Allen. 1995. Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity*. 2:655-63.
- Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H.G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 351:290-6.
- Fan, T., H. Lu, H. Hu, L. Shi, G.A. McClarty, D.M. Nance, A.H. Greenberg, and G. Zhong. 1998. Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med*. 187:487-96.
- Farris, A.D., C.L. Keech, T.P. Gordon, and J. McCluskey. 2000. Epitope mimics and determinant spreading: pathways to autoimmunity. *Cell Mol Life Sci*. 57:569-78.
- Fields, K.A., E. Fischer, and T. Hackstadt. 2002. Inhibition of fusion of Chlamydia trachomatis inclusions at 32 degrees C correlates with restricted export of IncA. *Infect Immun*. 70:3816-23.
- Fields, K.A., and T. Hackstadt. 2002. The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 18:221-45.
- Fiorillo, M.T., M. Maragno, R. Butler, M.L. Dupuis, and R. Sorrentino. 2000. CD8(+) T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *J Clin Invest*. 106:47-53.
- Fiorillo, M.T., C. Ruckert, M. Hulsmeier, R. Sorrentino, W. Saenger, A. Ziegler, and B. Uchanska-Ziegler. 2005. Allele-dependent similarity between viral and self-peptide presentation by HLA-B27 subtypes. *J Biol Chem*. 280:2962-71.
- Fling, S.P., R.A. Sutherland, L.N. Steele, B. Hess, S.E. D'Orazio, J. Maisonneuve, M.F. Lampe, P. Probst, and M.N. Starnbach. 2001. CD8+ T cells recognize an inclusion membrane-associated protein from the vacuolar pathogen Chlamydia trachomatis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 98:1160-1165.
- Fourneau, J.M., J.M. Bach, P.M. van Endert, and J.F. Bach. 2004. The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases. *Mol Immunol*. 40:1095-102.
- Frauendorf, E., H. von Goessel, E. May, and E. Marker-Hermann. 2003. HLA-B27-restricted T cells from patients with ankylosing spondylitis recognize peptides from B\*2705 that are similar to bacteria-derived peptides. *Clin Exp Immunol*. 134:351-9.

- Garboczi, D.N., P. Ghosh, U. Utz, Q.R. Fan, W.E. Biddison, and D.C. Wiley. 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*. 384:134-141.
- Garrett, T.P., M.A. Saper, P.J. Bjorkman, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature*. 342:692-696.
- Gerard, H.C., B. Krausse-Opatz, Z. Wang, D. Rudy, J.P. Rao, H. Zeidler, H.R. Schumacher, J.A. Whittum-Hudson, L. Kohler, and A.P. Hudson. 2001. Expression of Chlamydia trachomatis genes encoding products required for DNA synthesis and cell division during active versus persistent infection. *Mol.Microbiol.* 41:731-741.
- Gil-Torregrosa, B.C., A.R. Castano, and M. Del Val. 1998. Major histocompatibility complex class I viral antigen processing in the secretory pathway defined by the trans-Golgi network protease furin. *J.Exp.Med.* 188:1105-1116.
- Gil-Torregrosa, B.C., A.R. Castano, D. Lopez, and M. Del Val. 2000. Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic*. 1:641-651.
- Girschick, H.J., L. Guilherme, R.D. Inman, K. Latsch, M. Rihl, Y. Sherer, Y. Shoenfeld, H. Zeidler, S. Arienti, and A. Doria. 2008. Bacterial triggers and autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol*. 26:S12-7.
- Gomez, P., V. Montserrat, M. Marcilla, A. Paradela, and J.A. Lopez de Castro. 2006. B\*2707 differs in peptide specificity from B\*2705 and B\*2704 as much as from HLA-B27 subtypes not associated to spondyloarthritis. *Eur.J.Immunol.* 36:1867-1881.
- Gonzalez-Roces, S., M.V. Alvarez, S. Gonzalez, A. Dieye, H. Makni, D.G. Woodfield, L. Housan, V. Konenkov, M.C. Abbadi, N. Grunnet, E. Coto, and C. Lopez-Larrea. 1997. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens*. 49:116-123.
- Govindarajan, K.R., P. Kangueane, T.W. Tan, and S. Ranganathan. 2003. MPID: MHC-Peptide Interaction Database for sequence-structure-function information on peptides binding to MHC molecules. *Bioinformatics*. 19:309-10.
- Granfors, K. 1998. Host-microbe interaction in reactive arthritis: does HLA-B27 have a direct effect? *J Rheumatol*. 25:1659-61.
- Granfors, K., R. Merilahti-Palo, R. Luukkainen, T. Mottonen, R. Lahesmaa, P. Probst, E. Marker-Hermann, and P. Toivanen. 1998. Persistence of Yersinia antigens in peripheral blood cells from patients with Yersinia enterocolitica O:3 infection with or without reactive arthritis. *Arthritis Rheum*. 41:855-62.
- Griffin, T.A., D. Nandi, M. Cruz, H.J. Fehling, L.V. Kaer, J.J. Monaco, and R.A. Colbert. 1998. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J.Exp.Med.* 187:97-104.
- Groettrup, M., S. Standera, R. Stohwasser, and P.M. Kloetzel. 1997. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:8970-8975.
- Grottenbreg, G.M., N.R. Roan, E. Guillen, R. Meijers, J.H. Wang, G.W. Bell, M.N. Starnbach, and H.L. Ploegh. 2008. Discovery of CD8+ T cell epitopes in Chlamydia trachomatis infection through use of caged class I MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:3831-6.
- Guilherme, L., E. Cunha-Neto, V. Coelho, R. Snitcowsky, P.M. Pomerantzeff, R.V. Assis, F. Pedra, J. Neumann, A. Goldberg, M.E. Patarroyo, and et al. 1995. Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation*. 92:415-20.
- Guo, H.C., T.S. Jardetzky, T.P. Garrett, W.S. Lane, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1992. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle 2. *Nature*. 360:364-366.

- Hackstadt, T., E.R. Fischer, M.A. Scidmore, D.D. Rockey, and R.A. Heinzen. 1997. Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol.* 5:288-93.
- Hammer, R.E., S.D. Maika, J.A. Richardson, J.P. Tang, and J.D. Taurog. 1990. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human  $\alpha 2m$ : an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell.* 63:1099-1112.
- Hemmer, B., M. Vergelli, B. Gran, N. Ling, P. Conlon, C. Pinilla, R. Houghten, H.F. McFarland, and R. Martin. 1998. Predictable TCR antigen recognition based on peptide scans leads to the identification of agonist ligands with no sequence homology. *J Immunol.* 160:3631-6.
- Heuze, M.L., F.C. Guibal, C.A. Banks, J.W. Conaway, R.C. Conaway, Y.E. Cayre, A. Benecke, and P.G. Lutz. 2005. ASB2 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cullin 5 and Rbx1 to reconstitute an E3 ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem.* 280:5468-74.
- Hirsch, C., D. Blom, and H.L. Ploegh. 2003. A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *Embo J.* 22:1036-46.
- Hogan, R.J., S.A. Mathews, S. Mukhopadhyay, J.T. Summersgill, and P. Timms. 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun.* 72:1843-55.
- Huczko, E.L., W.M. Bodnar, D. Benjamin, K. Sakaguchi, N.Z. Zhu, J. Shabanowitz, R.A. Henderson, E. Appella, D.F. Hunt, and V.H. Engelhard. 1993. Characteristics of endogenous peptides eluted from the class I MHC molecule HLA-B7 determined by mass spectrometry and computer modeling. *J.Immunol.* 151:2572-2587.
- Hughes, E.A., and P. Cresswell. 1998. The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr.Biol.* 8:709-712.
- Hugo, P., J.W. Kappler, and P.C. Marrack. 1993. Positive selection of TcR alpha beta thymocytes: is cortical thymic epithelium an obligatory participant in the presentation of major histocompatibility complex protein? *Immunol Rev.* 135:133-55.
- Hulsmeyer, M., R.C. Hillig, A. Volz, M. Ruhl, W. Schroder, W. Saenger, A. Ziegler, and B. Uchanska-Ziegler. 2002. HLA-B27 subtypes differentially associated with disease exhibit subtle structural alterations. *J Biol Chem.* 277:47844-53.
- Igietseme, J.U., and R.G. Rank. 1991. Susceptibility to reinfection after a primary chlamydial genital infection is associated with a decrease of antigen-specific T cells in the genital tract. *Infect Immun.* 59:1346-51.
- Inman, R.D. 2006. Mechanisms of disease: infection and spondyloarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2:163-9.
- Jamaluddin, M., S. Wang, R.P. Garofalo, T. Elliott, A. Casola, S. Baron, and A.R. Brasier. 2001. IFN-beta mediates coordinate expression of antigen-processing genes in RSV-infected pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280:L248-57.
- Jardetzky, T.S., W.S. Lane, R.A. Robinson, D.R. Madden, and D.C. Wiley. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature.* 353:326-329.
- Jendro, M.C., F. Fingerle, T. Deutsch, A. Liese, L. Kohler, J.G. Kuipers, E. Raum, M. Martin, and H. Zeidler. 2004. Chlamydia trachomatis-infected macrophages induce apoptosis of activated T cells by secretion of tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Med Microbiol Immunol.* 193:45-52.
- Jendro, M.C., L. Kohler, J.G. Kuipers, and H. Zeidler. 2002. Microbe-induced T cell apoptosis: subversion of the host defense system? *FEMS Microbiol Lett.* 207:121-6.
- Jensen, F.C., A.J. Girardi, R.V. Gilden, and H. Koprowski. 1964. Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 52:53-9.
- Karunakaran, K.P., J. Rey-Ladino, N. Stoykov, K. Berg, C. Shen, X. Jiang, B.R. Gabel, H. Yu, L.J. Foster, and R.C. Brunham. 2008. Immunoproteomic discovery of novel T cell antigens from the obligate intracellular pathogen Chlamydia. *J.Immunol.* 180:2459-2465.
- Keat, A.C., R.N. Maini, G.C. Nkwazi, G.D. Pegrum, G.L. Ridgway, and J.T. Scott. 1978. Role of Chlamydia trachomatis and

- HLA-B27 in sexually acquired reactive arthritis. *Br.Med.J.* 1:605-607.
- Kersh, G.J., and P.M. Allen. 1996a. Essential flexibility in the T-cell recognition of antigen. *Nature.* 380:495-8.
- Kersh, G.J., and P.M. Allen. 1996b. Structural basis for T cell recognition of altered peptide ligands: a single T cell receptor can productively recognize a large continuum of related ligands. *J Exp Med.* 184:1259-68.
- Kessler, J.H., N.J. Beekman, S.A. Bres-Vloemans, P. Verdijk, P.A. van Veelen, A.M. Kloosterman-Joosten, D.C. Vissers, G.J. ten Bosch, M.G. Kester, A. Sijts, J. Wouter Drijfhout, F. Ossendorp, R. Offringa, and C.J. Melief. 2001. Efficient identification of novel HLA-A(\*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J Exp Med.* 193:73-88.
- Khan, M.A. 2002. Update on spondyloarthropathies. *Ann Intern Med.* 136:896-907.
- Kingsbury, D.J., J.P. Mear, D.P. Witte, J.D. Taurog, D.C. Roopenian, and R.A. Colbert. 2000. Development of spontaneous arthritis in beta2-microglobulin-deficient mice without expression of HLA-B27: association with deficiency of endogenous major histocompatibility complex class I expression. *Arthritis Rheum.* 43:2290-2296.
- Kisselev, A.F., A. Callard, and A.L. Goldberg. 2006. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J.Biol.Chem.* 281:8582-8590.
- Kleba, B., and R.S. Stephens. 2008. Chlamydial effector proteins localized to the host cell cytoplasmic compartment. *Infect Immun.* 76:4842-50.
- Kousa, M. 1982. Evidence of chlamydial involvement in the development of arthritis. *Scand J Infect Dis Suppl.* 32:116-21.
- Kruger, T., O. Schoor, C. Lemmel, B. Kraemer, C. Reichle, J. Dengjel, T. Weinschenk, M. Muller, J. Hennenlotter, A. Stenzl, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 2005. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 54:826-36.
- Kuckelkorn, U., T. Ruppert, B. Strehl, P.R. Jungblut, U. Zimny-Arndt, S. Lamer, I. Prinz, I. Drung, P.M. Kloetzel, S.H. Kaufmann, and U. Steinhoff. 2002. Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med.* 195:983-90.
- Kuipers, J.G., B. Jurgens-Saathoff, A. Bialowons, J. Wollenhaupt, L. Kohler, and H. Zeidler. 1998. Detection of Chlamydia trachomatis in peripheral blood leukocytes of reactive arthritis patients by polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.* 41:1894-5.
- Kuon, W., H.G. Holzhtutter, H. Appel, M. Grolms, S. Kollnberger, A. Traeder, P. Henklein, E. Weiss, A. Thiel, R. Lauster, P. Bowness, A. Radbruch, P.M. Kloetzel, and J. Sieper. 2001. Identification of HLA-B27-restricted peptides from the Chlamydia trachomatis proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J.Immunol.* 167:4738-4746.
- Lankat-Buttgereit, B., and R. Tampe. 2002. The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev.* 82:187-204.
- Lawson, C.M. 2000. Evidence for mimicry by viral antigens in animal models of autoimmune disease including myocarditis. *Cell Mol Life Sci.* 57:552-60.
- Leirisalo, M., G. Skylv, M. Kousa, L.M. Voipio-Pulkki, H. Suoranta, M. Nissila, L. Hvidman, E.D. Nielsen, A. Svejgaard, A. Tilikainen, and O. Laitinen. 1982. Followup study on patients with Reiter's disease and reactive arthritis, with special reference to HLA-B27. *Arthritis Rheum.* 25:249-59.
- Lin, M.L., Y. Zhan, J.A. Villadangos, and A.M. Lew. 2008a. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol Cell Biol.* 86:353-62.
- Lin, M.L., Y. Zhan, J.A. Villadangos, and A.M. Lew. 2008b. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol.Cell Biol.* 86:353-362.

- Lindquist, J.A., G.J. Hammerling, and J. Trowsdale. 2001. ER60/ERp57 forms disulfide-bonded intermediates with MHC class I heavy chain. *FASEB J.* 15:1448-1450.
- Lindquist, J.A., O.N. Jensen, M. Mann, and G.J. Hammerling. 1998. ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J.* 17:2186-2195.
- Little, H., D.R. Swinson, and B. Cruickshank. 1976. Upward subluxation of the axis in ankylosing spondylitis. A clinical pathologic report. *Am J Med.* 60:279-85.
- Ljunggren, H.G., N.J. Stam, C. Ohlen, J.J. Neefjes, P. Hoglund, M.T. Heemels, J. Bastin, T.N. Schumacher, A. Townsend, K. Karre, and H.L. Ploegh. 1990. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature.* 346:476-480.
- Lohmann, T., R.D. Leslie, and M. Londei. 1996. T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun.* 9:385-9.
- Long, E.O., S. Rosen-Bronson, D.R. Karp, M. Malnati, R.P. Sekaly, and D. Jaraquemada. 1991. Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and lymphoid cells. *Hum.Immunol.* 31:229-235.
- Loomis, W.P., and M.N. Starnbach. 2002. T cell responses to Chlamydia trachomatis. *Curr Opin Microbiol.* 5:87-91.
- Lopez-Larrea, C., K. Sujirachato, N.K. Mehra, P. Chiewsilp, D. Isarangkura, U. Kanga, O. Dominguez, E. Coto, M. Peña, F. Setien, and S. Gonzalez-Roces. 1995. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. *Tissue Antigens.* 45:169-176.
- Lopez, D., O. Calero, M. Jimenez, M. Garcia-Calvo, and M. Del Val. 2006. Antigen processing of a short viral antigen by proteasomes. *J Biol Chem.* 281:30315-8.
- Lopez de Castro, J., R. Bragado, D.M. Strong, and J.L. Strominger. 1983. Primary structure of papain-solubilized human histocompatibility antigen HLA-B40 (-Bw60). An outline of alloantigenic determinants. *Biochemistry.* 22:3961-9.
- Lopez de Castro, J.A., I. Alvarez, M. Marcilla, A. Paradela, M. Ramos, L. Sesma, and M. Vazquez. 2004. HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens.* 63:424-445.
- Loukissa, A., C. Cardozo, C. Altschuller-Felberg, and J.E. Nelson. 2000. Control of LMP7 expression in human endothelial cells by cytokines regulating cellular and humoral immunity. *Cytokine.* 12:1326-30.
- Luckey, C.J., J.A. Marto, M. Partridge, E. Hall, F.M. White, J.D. Lippolis, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and V.H. Engelhard. 2001. Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors. *J.Immunol.* 167:1212-1221.
- Madden, D.R. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu.Rev.Immunol.* 13:587-622.
- Madden, D.R., D.N. Garboczi, and D.C. Wiley. 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2 [published erratum appears in Cell 1994 Jan 28;76(2):following 410]. *Cell.* 75:693-708.
- Madden, D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1991. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature.* 353:321-325.
- Madden, D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell.* 70:1035-1048.
- Magnusson, O.T., H. Toyama, M. Saeki, A. Rojas, J.C. Reed, R.C. Liddington, J.P. Klinman, and R. Schwarzenbacher. 2004. Quinone biogenesis: Structure and mechanism of PqqC, the final catalyst in the production of pyrroloquinoline quinone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:7913-8.



- Marcilla, M., J.J. Cragnolini, and J.A. Lopez de Castro. 2007. Proteasome-independent HLA-B27 ligands arise mainly from small basic proteins. *Mol.Cell Proteomics*. 6:923-938.
- Marcilla, M., and J.A. Lopez de Castro. 2008. Peptides: the cornerstone of HLA-B27 biology and pathogenetic role in spondyloarthritis. *Tissue Antigens*. 71:495-506.
- Marcilla, M., E.M. Villasevil, and J.A. Lopez de Castro. 2008. Tripeptidyl peptidase II is dispensable for the generation of both proteasome-dependent and proteasome-independent ligands of HLA-B27 and other class I molecules. *Eur.J.Immunol*. 38:631-639.
- Marrack, P., K. Rubtsova, J. Scott-Browne, and J.W. Kappler. 2008. T cell receptor specificity for major histocompatibility complex proteins. *Curr Opin Immunol*. 20:203-7.
- May, E., N. Dulphy, E. Frauendorf, R. Duchmann, P. Bowness, J.A. Lopez de Castro, A. Toubert, and E. Marker-Hermann. 2002. Conserved TCR  $\alpha$  chain usage in reactive arthritis; evidence for selection by a putative HLA-B27-associated autoantigen. *Tissue Antigens*. 60:299-308.
- Mear, J.P., K.L. Schreiber, C. Mnz, X. Zhu, S. Stevanovic, H.G. Rammensee, S.L. Rowland-Jones, and R.A. Colbert. 1999. Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J.Immunol*. 163:6665-6670.
- Merino, E., V. Montserrat, A. Paradelo, and J.A. Lopez de Castro. 2005. Two HLA-B14 subtypes (B\*1402 and B\*1403) differentially associated with ankylosing spondylitis differ substantially in peptide specificity, but have limited peptide and T-cell epitope sharing with HLA-B27. *J.Biol.Chem*. 280:35868-35880.
- Momburg, F., J. Roelse, J.C. Howard, G.W. Butcher, G.J. Hammerling, and J.J. Neefjes. 1994. Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature*. 367:648-651.
- Monaco, J.J., S. Cho, and M. Attaya. 1990. Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. *Science*. 250:1723-6.
- Morrice, N.A., and S.J. Powis. 1998. A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Curr.Biol*. 8:713-716.
- Murphy, K., P. Travers, and M. Walport. 2008. Janeway's Immunobiology. Seventh Edition. Garland Science.
- Nanagara, R., F. Li, A. Beutler, A. Hudson, and H.R. Schumacher, Jr. 1995. Alteration of Chlamydia trachomatis biologic behavior in synovial membranes. Suppression of surface antigen production in reactive arthritis and Reiter's syndrome. *Arthritis Rheum*. 38:1410-7.
- Nasution, A.R., A. Mardjuadi, S. Kunmartini, N.G. Suryadhana, B. Setyohadi, D. Sudarsono, N.M. Lardy, and T.E. Feltkamp. 1997. HLA-B27 subtypes positively and negatively associated with spondyloarthropathy. *J.Rheumatol*. 24:1111-1114.
- Ohashi, P.S. 1996. T cell selection and autoimmunity: flexibility and tuning. *Curr Opin Immunol*. 8:808-14.
- Ohashi, P.S. 2002. T-cell signalling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease. *Nat Rev Immunol*. 2:427-38.
- Ohashi, P.S., and A.L. DeFranco. 2002. Making and breaking tolerance. *Curr Opin Immunol*. 14:744-59.
- Oldstone, M.B. 2005. Molecular mimicry, microbial infection, and autoimmune disease: evolution of the concept. *Curr Top Microbiol Immunol*. 296:1-17.
- Olsen, A.W., F. Follmann, P. Hojrup, R. Leah, C. Sand, P. Andersen, and M. Theisen. 2007. Identification of human T cell targets recognized during Chlamydia trachomatis genital infection. *J.Infect.Dis*. 196:1546-1552.
- Orr, H.T., J.A. Lopez de Castro, D. Lancet, and J.L. Strominger. 1979. Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen, HLA-B7. 2. Sequence determination and search for homologies. *Biochemistry*. 18:5711-20.

- Ortmann, B., J. Copeman, P.J. Lehner, B. Sadasivan, J.A. Herberg, A.G. Grandea, S.R. Riddell, R. Tampe, T. Spies, J. Trowsdale, and P. Cresswell. 1997. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*. 277:1306-1309.
- Owen, J.J., and E.J. Jenkinson. 1992. Apoptosis and T-cell repertoire selection in the thymus. *Ann N Y Acad Sci*. 663:305-10.
- Owen, J.J., D.E. McLoughlin, R.K. Suniara, and E.J. Jenkinson. 2000. The role of mesenchyme in thymus development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 251:133-7.
- Paladini, F., E. Taccari, M.T. Fiorillo, A. Cauli, G. Passiu, A. Mathieu, L. Punzi, G. Lapadula, R. Scarpa, and R. Sorrentino. 2005. Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. *Arthritis Rheum*. 52:3319-3321.
- Pamer, E., and P. Cresswell. 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu.Rev.Immunol*. 16:323-358.
- Paradela, A., M. Garcia-Peydro, J. Vazquez, D. Rognan, and J.A. Lopez de Castro. 1998. The same natural ligand is involved in allorecognition of multiple HLA-B27 subtypes by a single T cell clone: role of peptide and the MHC molecule in alloreactivity. *J.Immunol*. 161:5481-5490.
- Park, B., S. Lee, E. Kim, K. Cho, S.R. Riddell, S. Cho, and K. Ahn. 2006. Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell*. 127:369-382.
- Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat.Immunol*. 6:1133-1141.
- Paulsson, K., and P. Wang. 2003. Chaperones and folding of MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Biochim.Biophys.Acta*. 1641:1-12.
- Peters, J., D.P. Wilson, G. Myers, P. Timms, and P.M. Bavoil. 2007. Type III secretion a la Chlamydia. *Trends Microbiol*. 15:241-51.
- Popov, I., C.S. Dela Cruz, B.H. Barber, B. Chiu, and R.D. Inman. 2002. Breakdown of CTL tolerance to self HLA-B\*2705 induced by exposure to Chlamydia trachomatis. *J Immunol*. 169:4033-8.
- Purbhoo, M.A., D.J. Irvine, J.B. Huppa, and M.M. Davis. 2004. T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat.Immunol*. 5:524-530.
- Qian, S.B., M.F. Princiotta, J.R. Bennink, and J.W. Yewdell. 2006a. Characterization of rapidly degraded polypeptides in mammalian cells reveals a novel layer of nascent protein quality control. *J Biol Chem*. 281:392-400.
- Qian, S.B., E. Reits, J. Neefjes, J.M. Deslich, J.R. Bennink, and J.W. Yewdell. 2006b. Tight linkage between translation and MHC class I peptide ligand generation implies specialized antigen processing for defective ribosomal products. *J Immunol*. 177:227-33.
- Rammensee, H.G., O. Rotzschke, and K. Falk. 1993. MHC class I-restricted antigen processing--lessons from natural ligands. *Chem Immunol*. 57:113-33.
- Ramos, M., I. Alvarez, F. Garcia-del-Portillo, and J.A. Lopez de Castro. 2001. Minimal alterations in the HLA-B27-bound peptide repertoire induced upon infection of lymphoid cells with Salmonella typhimurium. *Arthritis Rheum*. 44:1677-1688.
- Ramos, M., I. Alvarez, L. Sesma, A. Logean, D. Rognan, and J.A. Lopez de Castro. 2002a. Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J Biol Chem*. 277:37573-81.
- Ramos, M., and J.A. Lopez de Castro. 2002. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens*. 60:191-205.
- Ramos, M., A. Paradela, M. Vazquez, A. Marina, J. Vazquez, and J.A. Lopez de Castro. 2002b. Differential association of HLA-B\*2705 and B\*2709 to ankylosing spondylitis correlates with limited peptide subsets but not with altered cell surface stability. *J.Biol.Chem*. 277:28749-28756.

- Reits, E., J. Neijssen, C. Herberts, W. Benckhuijsen, L. Janssen, J.W. Drijfhout, and J. Neefjes. 2004. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity*. 20:495-506.
- Reits, E.A., J.C. Vos, M. Gromme, and J. Neefjes. 2000. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*. 404:774-778.
- Ren, E.C., W.H. Koh, D. Sim, M.L. Boey, G.B. Wee, and S.H. Chan. 1997. Possible protective role of HLA-B\*2706 for ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens*. 49:67-69.
- Reth, M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature*. 338:383-4.
- Rich, E., E.W. Hook, 3rd, G.S. Alarcon, and L.W. Moreland. 1996. Reactive arthritis in patients attending an urban sexually transmitted diseases clinic. *Arthritis Rheum*. 39:1172-7.
- Rihl, M., A. Klos, L. Kohler, and J.G. Kuipers. 2006. Infection and musculoskeletal conditions: Reactive arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 20:1119-37.
- Ringrose, J.H., H.D. Meiring, D. Speijer, T.E. Feltkamp, C.A. van Els, A.P. de Jong, and J. Dankert. 2004. Major histocompatibility complex class I peptide presentation after *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection assessed via stable isotope tagging of the B27-presented peptide repertoire. *Infect Immun*. 72:5097-105.
- Roan, N.R., and M.N. Starnbach. 2008. Immune-mediated control of *Chlamydia* infection. *Cell Microbiol*. 10:9-19.
- Rock, K.L., and A. Goldberg. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu.Rev.Immunol*. 17:739-779.
- Rock, K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A.L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 78:761-771.
- Rock, K.L., I.A. York, and A.L. Goldberg. 2004. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol*. 5:670-7.
- Rose, N.R., and I.R. Mackay. 2000. Molecular mimicry: a critical look at exemplary instances in human diseases. *Cell Mol Life Sci*. 57:542-51.
- Rudolph, M.G., and I.A. Wilson. 2002. The specificity of TCR/pMHC interaction. *Curr Opin Immunol*. 14:52-65.
- Ruppert, J., J. Sidney, E. Celis, R.T. Kubo, H.M. Grey, and A. Sette. 1993. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA- A2.1 molecules. *Cell*. 74:929-937.
- Sadasivan, B., P.J. Lehner, B. Ortmann, T. Spies, and P. Cresswell. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*. 5:103-114.
- Saper, M.A., P.J. Bjorkman, and D.C. Wiley. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J.Mol.Biol*. 219:277-319.
- Saric, T., S.C. Chang, A. Hattori, I.A. York, S. Markant, K.L. Rock, M. Tsujimoto, and A.L. Goldberg. 2002. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat.Immunol*. 3:1169-1176.
- Saveanu, L., O. Carroll, Y. Hassainya, and P. van Endert. 2005a. Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunol.Rev*. 207:42-59.
- Saveanu, L., O. Carroll, V. Lindo, M. Del Val, D. Lopez, Y. Lepelletier, F. Greer, L. Schomburg, D. Fruci, G. Niedermann, and P.M. Van Endert. 2005b. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat.Immunol*. 6:689-697.
- Scofield, R.H., B. Kurien, T. Gross, W.L. Warren, and J.B. Harley. 1995. HLA-B27 binding of peptide from its own sequence and similar peptides from bacteria: implications for spondyloarthropathies. *Lancet*. 345:1542-4.

- Scofield, R.H., W.L. Warren, G. Koelsch, and J.B. Harley. 1993. A hypothesis for the HLA-B27 immune dysregulation in spondyloarthropathy: contributions from enteric organisms, B27 structure, peptides bound by B27, and convergent evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:9330-4.
- Scherer, W.F., J.T. Syverton, and G.O. Gey. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 97:695-710.
- Schwarzenbacher, R., F. Stenner-Liewen, H. Liewen, J.C. Reed, and R.C. Liddington. 2004a. Crystal structure of PqqC from *Klebsiella pneumoniae* at 2.1 Å resolution. *Proteins.* 56:401-3.
- Schwarzenbacher, R., F. Stenner-Liewen, H. Liewen, H. Robinson, H. Yuan, E. Bossy-Wetzel, J.C. Reed, and R.C. Liddington. 2004b. Structure of the *Chlamydia* protein CADD reveals a redox enzyme that modulates host cell apoptosis. *J Biol Chem.* 279:29320-4.
- Schwarzenbacher, R., F. Stenner-Liewen, H. Liewen, H. Robinson, H. Yuan, E. Bossy-Wetzel, J.C. Reed, and R.C. Liddington. 2004c. Structure of the *Chlamydia* protein CADD reveals a redox enzyme that modulates host cell apoptosis. *J.Biol.Chem.* 279:29320-29324.
- Seeger, F.H., M. Schirle, J. Gatfield, D. Arnold, W. Keilholz, P. Nickolaus, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic. 1999. The HLA-A\*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. *Immunogenetics.* 49:571-6.
- Semana, G., R. Gausling, R.A. Jackson, and D.A. Hafler. 1999. T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J Autoimmun.* 12:259-67.
- Serwold, T., S. Gaw, and N. Shastri. 2001. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat.Immunol.* 2:644-651.
- Serwold, T., F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob, and N. Shastri. 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature.* 419:480-483.
- Serwold, T., and N. Shastri. 1999. Specific proteolytic cleavages limit the diversity of the pool of peptides available to MHC class I molecules in living cells. *J.Immunol.* 162:4712-4719.
- Sesma, L., V. Montserrat, J.R. Lamas, A. Marina, J. Vazquez, and J.A. Lopez de Castro. 2002. The peptide repertoires of HLA-B27 subtypes differentially associated to spondyloarthropathy (B\*2704 and B\*2706) differ by specific changes at three anchor positions. *J.Biol.Chem.* 277:16744-16749.
- Shen, L., L.J. Sigal, M. Boes, and K.L. Rock. 2004. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity.* 21:155-165.
- Sigal, L.H. 2001. Update on reactive arthritis. *Bull Rheum Dis.* 50:1-4.
- Sitia, R., and I. Braakman. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature.* 426:891-4.
- Skipp, P., J. Robinson, C.D. O'Connor, and I.N. Clarke. 2005. Shotgun proteomic analysis of *Chlamydia trachomatis*. *Proteomics.* 5:1558-73.
- Spies, T., M. Bresnahan, S. Bahram, D. Arnold, G. Blanck, E. Mellins, D. Pious, and R. DeMars. 1990. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature.* 348:744-7.
- Starnbach, M.N., W.P. Loomis, P. Ovendale, D. Regan, B. Hess, M.R. Alderson, and S.P. Fling. 2003. An inclusion membrane protein from *Chlamydia trachomatis* enters the MHC class I pathway and stimulates a CD8+ T cell response. *J.Immunol.* 171:4742-4749.
- Steen, H., and M. Mann. 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:699-711.
- Stenner-Liewen, F., H. Liewen, J.M. Zapata, K. Pawlowski, A. Godzik, and J.C. Reed. 2002a. CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors. *J.Biol.Chem.* 277:9633-9636.

- Stenner-Liewen, F., H. Liewen, J.M. Zapata, K. Pawlowski, A. Godzik, and J.C. Reed. 2002b. CADD, a Chlamydia protein that interacts with death receptors. *J Biol Chem.* 277:9633-6.
- Storkus, W.J., D.N. Howell, R.D. Salter, J.R. Dawson, and P. Cresswell. 1987. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J.Immunol.* 138:1657-1659.
- Swanborg, R.H., D.L. Boros, J.A. Whittum-Hudson, and A.P. Hudson. 2006. Molecular mimicry and horror autotoxicus: do chlamydial infections elicit autoimmunity? *Expert Rev Mol Med.* 8:1-23.
- Sykulev, Y., M. Joo, I. Vturina, T.J. Tsomides, and H.N. Eisen. 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity.* 4:565-71.
- Tanioka, T., A. Hattori, S. Masuda, Y. Nomura, H. Nakayama, S. Mizutani, and M. Tsujimoto. 2003. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase: the third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J.Biol.Chem.* 278:32275-32283.
- Taurog, J.D., S.D. Maika, N. Satumtira, M.L. Dorris, I.L. McLean, H. Yanagisawa, A. Sayad, A.J. Stagg, G.M. Fox, A. Le O'Brien, M. Rehman, M. Zhou, A.L. Weiner, J.B. Splawski, J.A. Richardson, and R.E. Hammer. 1999. Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol.Rev.* 169:209-223.
- Taurog, J.D., S.D. Maika, W.A. Simmons, M. Breban, and R.E. Hammer. 1993. Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *J.Immunol.* 150:4168-4178.
- Taurog, J.D., J.A. Richardson, J.T. Croft, W.A. Simmons, M. Zhou, J.L. Fernandez Sueiro, E. Balish, and R.E. Hammer. 1994. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J.Exp.Med.* 180:2359-2364.
- Trowsdale, J., I. Hanson, I. Mockridge, S. Beck, A. Townsend, and A. Kelly. 1990. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature.* 348:741-4.
- Uchanska-Ziegler, B., and A. Ziegler. 2003. Ankylosing spondylitis: a beta2m-deposition disease? *Trends Immunol.* 24:73-76.
- Uebel, S., and R. Tampe. 1999. Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr Opin Immunol.* 11:203-8.
- Unno, M., T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka, and T. Tsukihara. 2002. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure.* 10:609-618.
- van Endert, P. 2008. Role of tryptidyl peptidase II in MHC class I antigen processing: the end of controversies? *Eur.J.Immunol.* 38:609-613.
- Vassilakos, A., M.F. Cohen-Doyle, P.A. Peterson, M.R. Jackson, and D.B. Williams. 1996. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J.* 15:1495-1506.
- Versalovic, J., and J.R. Lupski. 1993. The Haemophilus influenzae dnaG sequence and conserved bacterial primase motifs. *Gene.* 136:281-6.
- Voigt, A., U. Salzmann, U. Seifert, M. Dathe, A. Soza, P.M. Kloetzel, and U. Kuckelkorn. 2007. 20S proteasome-dependent generation of an IEpp89 murine cytomegalovirus-derived H-2L(d) epitope from a recombinant protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 355:549-54.
- Vos, J.C., P. Spee, F. Momburg, and J. Neefjes. 1999. Membrane topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three-domain structure. *J Immunol.* 163:6679-85.
- Walker, L.S., and A.K. Abbas. 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol.* 2:11-9.
- Wearsch, P.A., and P. Cresswell. 2008. The quality control of MHC class I peptide loading. *Curr Opin Cell Biol.* 20:624-31.
- Weinschenk, T., C. Gouttefangeas, M. Schirle, F. Obermayr, S. Walter, O. Schoor, R. Kurek,

- W. Loeser, K.H. Bichler, D. Wernet, S. Stevanovic, and H.G. Rammensee. 2002. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* 62:5818-27.
- Wiertz, E.J., D. Tortorella, M. Bogoy, J. Yu, W. Mothes, T.R. Jones, T.A. Rapoport, and H.L. Ploegh. 1996. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature.* 384:432-438.
- Wucherpennig, K.W. 2005. The structural interactions between T cell receptors and MHC-peptide complexes place physical limits on self-nonself discrimination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 296:19-37.
- Wucherpennig, K.W., and J.L. Strominger. 1995. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell.* 80:695-705.
- Yague, J., I. Alvarez, D. Rognan, M. Ramos, J. Vazquez, and J.A. Lopez de Castro. 2000. An N-acetylated Natural Ligand of Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-B39. Classical major histocompatibility complex class I proteins bind peptides with a blocked NH2 terminus in vivo. *J.Exp.Med.* 191:2083-2092.
- Yewdell, J.W., L.C. Anton, and J.R. Bennink. 1996. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J.Immunol.* 157:1823-1826.
- Yewdell, J.W., and C.V. Nicchitta. 2006. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol.* 27:368-73.
- Yewdell, J.W., E. Reits, and J. Neefjes. 2003. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat.Rev.Immunol.* 3:952-961.
- York, I.A., N. Bhutani, S. Zendzian, A.L. Goldberg, and K.L. Rock. 2006. Tripeptidyl Peptidase II Is the Major Peptidase Needed to Trim Long Antigenic Precursors, but Is Not Required for Most MHC Class I Antigen Presentation. *J.Immunol.* 177:1434-1443.
- York, I.A., S.C. Chang, T. Saric, J.A. Keys, J.M. Favreau, A.L. Goldberg, and K.L. Rock. 2002. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat.Immunol.* 3:1177-1184.
- Young, A.C., S.G. Nathenson, and J.C. Sacchettini. 1995a. Structural studies of class I major histocompatibility complex proteins: insights into antigen presentation. *Faseb J.* 9:26-36.
- Young, A.C., W. Zhang, J.C. Sacchettini, and S.G. Nathenson. 1995b. MHC class I-peptide interactions and TCR recognition. *Cancer Surv.* 22:17-36.
- Young, J.L., L. Smith, M.K. Matyszak, and J.S. Gaston. 2001. HLA-B27 expression does not modulate intracellular Chlamydia trachomatis infection of cell lines. *Infect Immun.* 69:6670-5.
- Yuki, N. 2000. Current cases in which epitope mimicry is considered a component cause of autoimmune disease: Guillain-Barre syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 57:527-33.
- Zeidler, H., J. Kuipers, and L. Kohler. 2004. Chlamydia-induced arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 16:380-92.
- Zemmour, J., A.M. Little, D.J. Schendel, and P. Parham. 1992. The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J.Immunol.* 148:1941-1948.
- Zhong, G., P. Fan, H. Ji, F. Dong, and Y. Huang. 2001. Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J.Exp.Med.* 193:935-942.
- Zhong, G., T. Fan, and L. Liu. 1999. Chlamydia inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J.Exp.Med.* 189:1931-1938.

- Zhong, G., L. Liu, T. Fan, P. Fan, and H. Ji. 2000. Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in chlamydia-infected cells. *J.Exp.Med.* 191:1525-1534.
- Zhou, W., Y.V. Bertsova, B. Feng, P. Tsatsos, M.L. Verkhovskaya, R.B. Gennis, A.V. Bogachev, and B. Barquera. 1999. Sequencing and preliminary characterization of the Na<sup>+</sup>-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry.* 38:16246-52.





Ligandos de HLA-B27 presentados  
diferencialmente en células humanas  
transfectadas con proteínas de  
*Chlamydia trachomatis*

## *Anexo I*



Ligandos de HLA-B27 presentados diferencialmente en células humanas transfectadas con proteínas de *Chlamydia trachomatis*

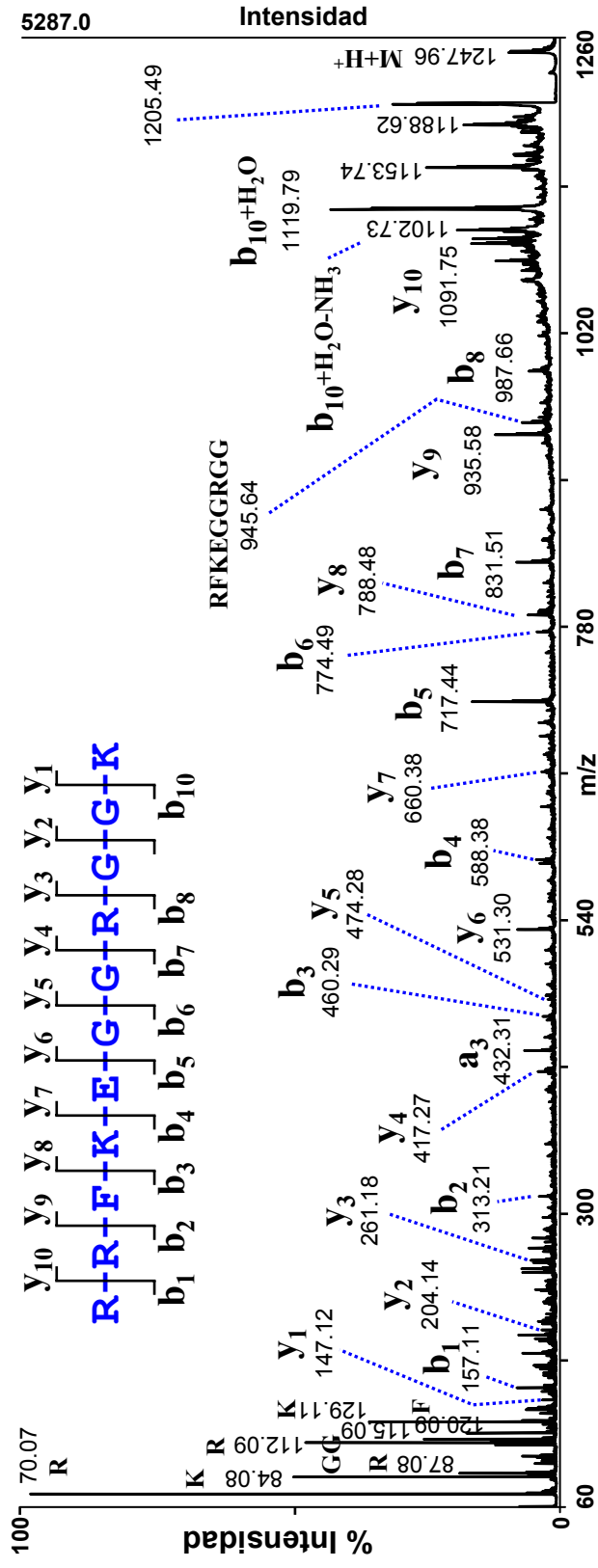
Péptido n°	Secuencia	Péptido (residuos)	Transfectante	Gen	Swiss-Prot n°	Fracción HPLC	(M+H) <sup>+</sup>	(M+3H) <sup>+3</sup>
1	RRFKEGGRGGK	P(211-221)	P(90-450)	CT794	O84799	105	1247.3	
2	RRINREAERFF	P(112-122)	P(90-450)	CT794	O84799	134	1493.8	498.6
3	RRINREAERF	P(112-121)	P(90-450)	CT794	O84799	162	1346.3	449.6
4	KRALLEIVI	NQRA(86-94)	NQRA(1-465)	CT634	O84639	208	1054.7	
5	ARKLLLDNL	PqQC(70-78)	PqQC(1-231)	CT610	O84616	184	1055.7	
6	TRFSYAEYF*	ASB2(2-10)	PqQC(1-231)	ASB2	Q96Q27	182	1183.5	

\* Todos los péptidos provienen de *Chlamydia trachomatis*, con excepción del péptido n° 6 el cual proviene de una proteína humana.  
P, DNA primasa. NQRA, NADH-quinona reductasa transportadora de Na<sup>+</sup>, subunidad A. PqQC, proteína tipo piroloquinolina-quinona sintasa. ASB2, proteína con dominios repetidos de ankirina y caja SOCS 2.

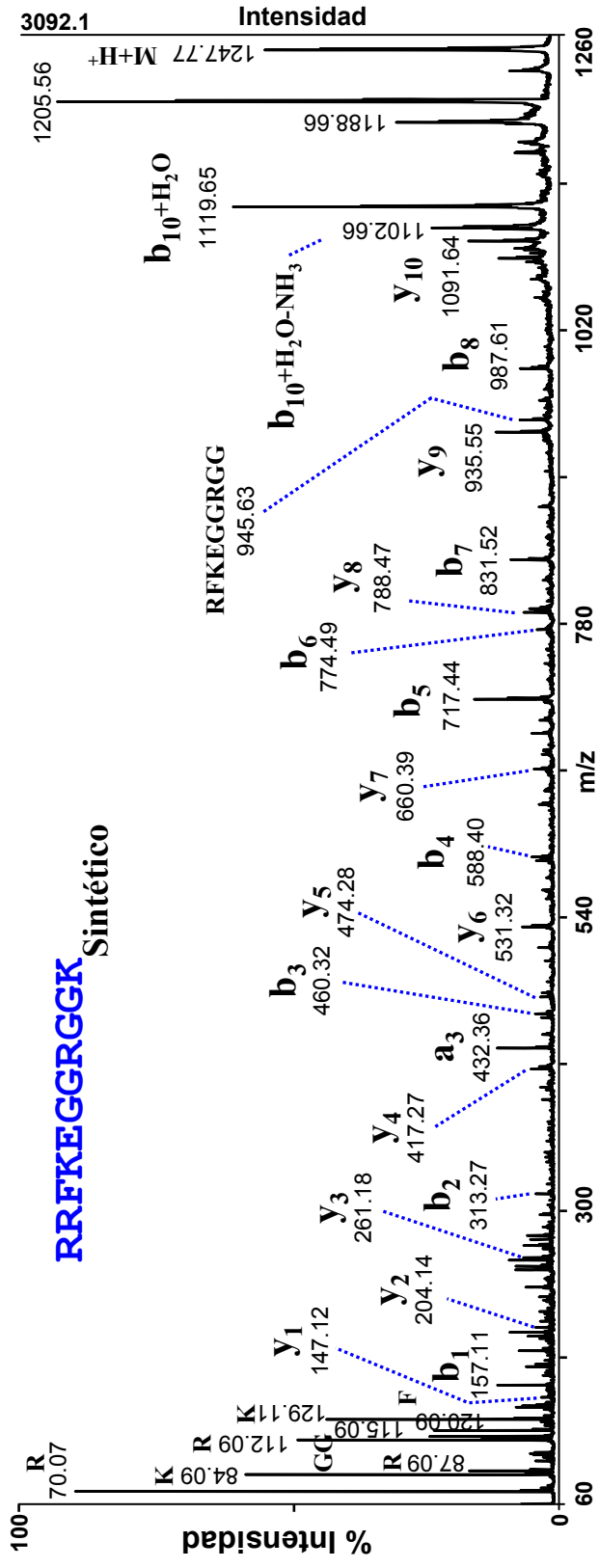
Ligandos de HLA-B27 presentados diferencialmente en células humanas transfectadas con proteínas de *Chlamydia trachomatis*

- ➔ Espectros de fragmentación MS/MS
- ➔ Listado de los iones teóricos (MS-product) y de los iones observados de las secuencias asignadas
- ➔ *Se señalan los iones observados para cada péptido bacteriano y el correspondiente péptido sintético*

**A**

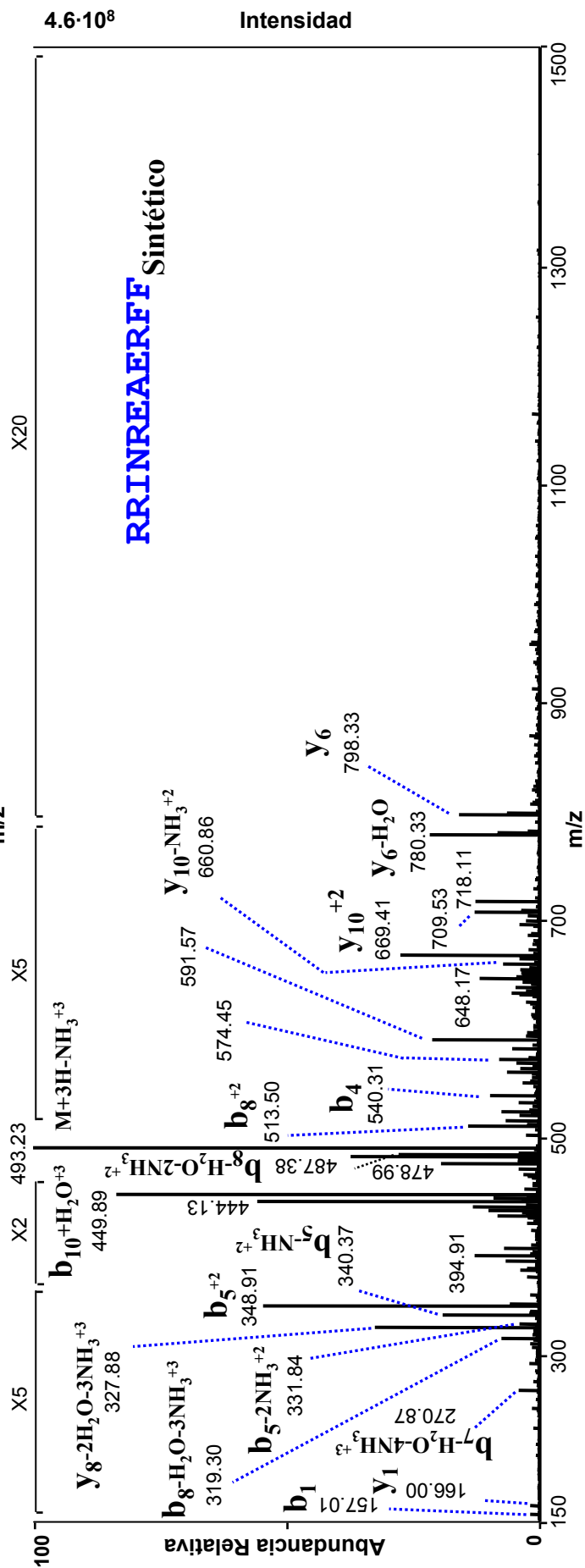
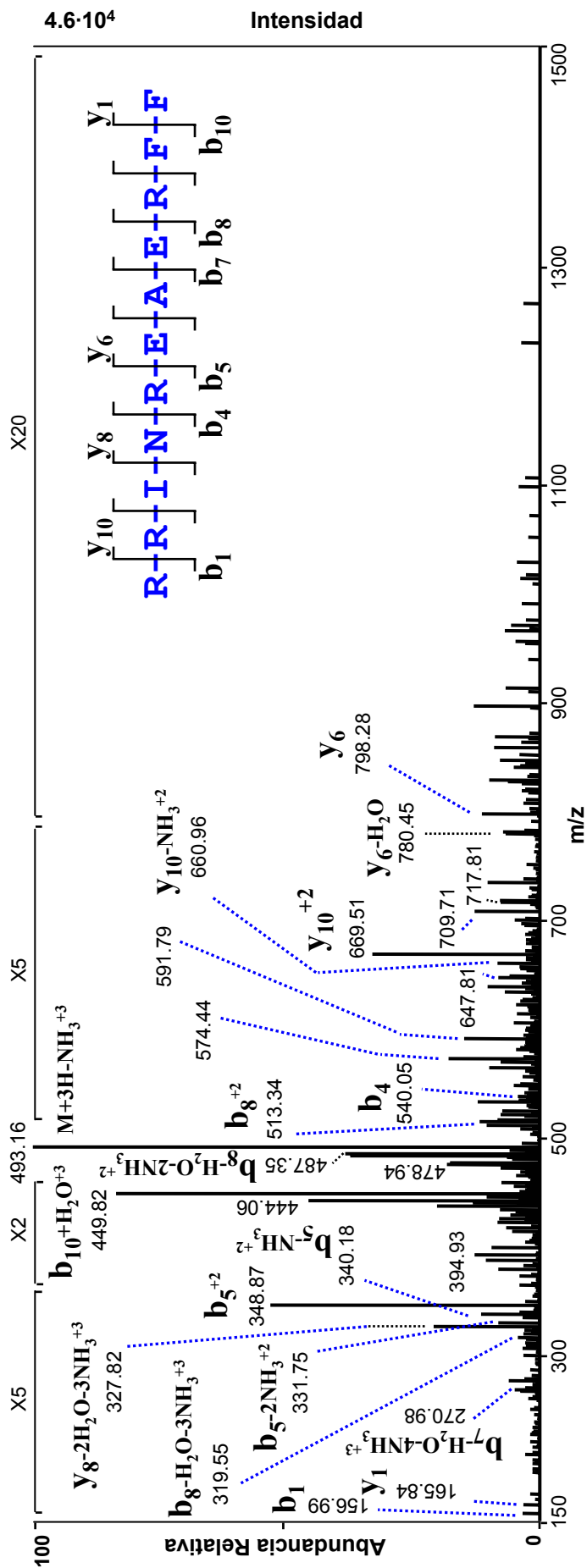


**B**



Péptido nº1 "RRFKEGGRGGK"

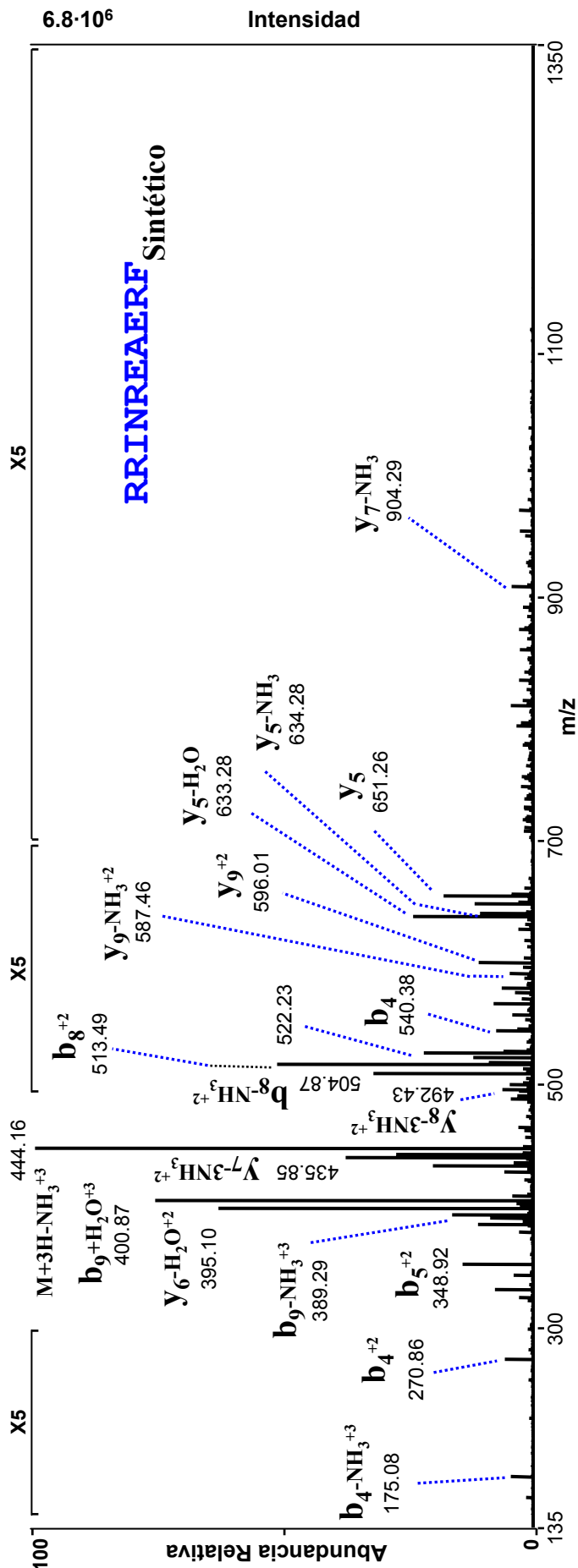
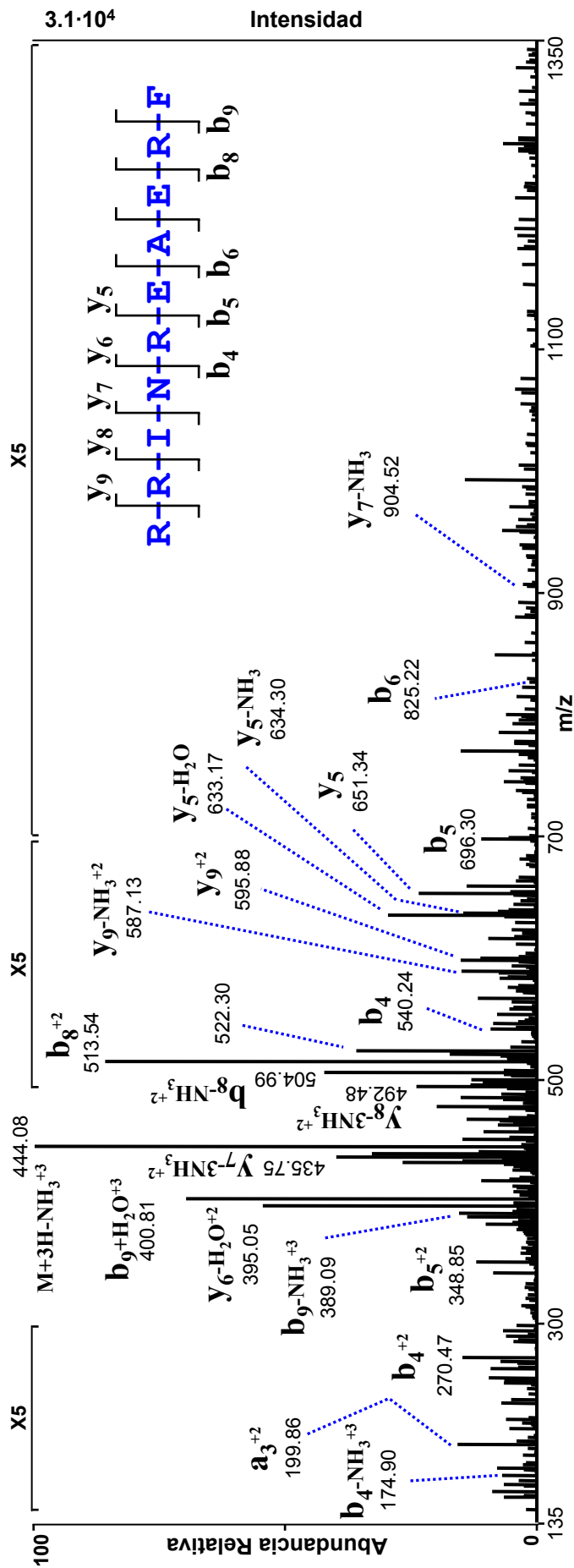
Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	
70,07	70,07	R	a <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>	268,19	268,19	a <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>	429,22	EGGRG-28	600,33	RFKEG-H <sub>2</sub> O	803,46	RFKEGGR-28
84,08	84,08	K	RG	271,15	271,15	RG	432,27	RFK	601,31	RFKEG-NH <sub>3</sub>	813,45	b <sub>7</sub> -H <sub>2</sub> O
87,06	87,06	GG-28	GR	271,15	271,15	GR	432,28	a <sub>3</sub>	614,34	KEGGRGG-28	813,45	RFKEGGR-H <sub>2</sub> O
87,09	87,09	R	G	271,15	271,15	G	434,24	FKEG-28	618,34	RFKEG	814,43	b <sub>7</sub> -NH <sub>3</sub>
100,09	100,09	R	FK	276,17	276,17	FK	439,20	EGGRG-H <sub>2</sub> O	624,32	KEGGRGG-H <sub>2</sub> O	814,43	RFKEGGR-NH <sub>3</sub>
101,11	101,11	K	RF-28	276,18	276,18	RF-28	440,19	EGGRG-NH <sub>3</sub>	625,31	KEGGRGG-NH <sub>3</sub>	831,46	b <sub>7</sub>
102,06	102,06	E	a <sub>2</sub>	285,21	285,21	a <sub>2</sub>	443,25	b <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>	642,33	KEGGRGG	831,46	RFKEGGR
112,09	112,09	R	RF-NH <sub>3</sub>	287,15	287,15	RF-NH <sub>3</sub>	444,22	FKEG-H <sub>2</sub> O	642,33	y <sub>7</sub> -H <sub>2</sub> O	860,48	RFKEGGRG-28
115,05	115,05	GG	KEG-28	287,17	287,17	KEG-28	445,21	FKEG-NH <sub>3</sub>	643,32	y <sub>7</sub> -NH <sub>3</sub>	870,47	RFKEGGRG-H <sub>2</sub> O
120,08	120,08	F	b <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>	296,18	296,18	b <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>	457,22	EGGRG	647,36	FKEGGR-28	871,45	RFKEGGRG-NH <sub>3</sub>
129,10	129,10	K	KEG-H <sub>2</sub> O	297,16	297,16	KEG-H <sub>2</sub> O	457,25	y <sub>5</sub> -NH <sub>3</sub>	647,36	RFKEGG-28	888,48	RFKEGGRG
130,09	130,09	y <sub>7</sub> -NH <sub>3</sub>	KEG-NH <sub>3</sub>	298,14	298,14	KEG-NH <sub>3</sub>	460,28	b <sub>3</sub>	657,35	RFKEGG-H <sub>2</sub> O	917,50	y <sub>9</sub> -H <sub>2</sub> O
147,11	147,11	y <sub>1</sub>	GRGG-28	300,18	300,18	GRGG-28	462,23	FKEG	657,35	FKEGGR-H <sub>2</sub> O	917,51	RFKEGGRGG-28
157,10	157,10	b <sub>1</sub>	GGRG-28	300,18	300,18	GGRG-28	474,28	y <sub>5</sub>	658,33	RFKEGG-NH <sub>3</sub>	918,48	y <sub>9</sub> -NH <sub>3</sub>
159,08	159,08	EG-28	RF	304,18	304,18	RF	486,24	EGGRG-28	658,33	FKEGGR-NH <sub>3</sub>	927,49	RFKEGGRGG-H <sub>2</sub> O
169,06	169,06	EG-H <sub>2</sub> O	GRGG-NH <sub>3</sub>	311,15	311,15	GRGG-NH <sub>3</sub>	491,26	FKEGG-28	660,34	y <sub>7</sub>	928,47	RFKEGGRGG-NH <sub>3</sub>
186,13	186,13	RG-28	GGRG-NH <sub>3</sub>	311,15	311,15	GGRG-NH <sub>3</sub>	496,23	EGGRGG-H <sub>2</sub> O	672,39	a <sub>5</sub> -NH <sub>3</sub>	935,51	y <sub>9</sub>
186,13	186,13	GR-28	b <sub>2</sub>	313,21	313,21	b <sub>2</sub>	497,21	EGGRGG-NH <sub>3</sub>	675,36	FKEGGR	942,54	a <sub>8</sub> -NH <sub>3</sub>
187,07	187,07	EG	KEG	315,17	315,17	KEG	500,29	KEGGR-28	675,36	RFKEGG	945,50	RFKEGGRGG
187,11	187,11	y <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>	GRGG	328,17	328,17	GRGG	501,25	FKEGG-H <sub>2</sub> O	689,42	a <sub>5</sub>	959,56	a <sub>8</sub>
197,10	197,10	RG-NH <sub>3</sub>	GGRG	328,17	328,17	GGRG	502,23	FKEGG-NH <sub>3</sub>	699,40	b <sub>5</sub> -H <sub>2</sub> O	969,55	b <sub>8</sub> -H <sub>2</sub> O
197,10	197,10	GR-NH <sub>3</sub>	KEGG-28	344,19	344,19	KEGG-28	510,28	KEGGR-H <sub>2</sub> O	700,39	b <sub>5</sub> -NH <sub>3</sub>	970,53	b <sub>8</sub> -NH <sub>3</sub>
204,13	204,13	y <sub>2</sub>	KEGG-H <sub>2</sub> O	354,18	354,18	KEGG-H <sub>2</sub> O	511,26	KEGGR-NH <sub>3</sub>	704,38	FKEGGRG-28	987,56	b <sub>8</sub>
214,13	214,13	RG / GR	KEGG-NH <sub>3</sub>	355,16	355,16	KEGG-NH <sub>3</sub>	514,24	EGGRG	714,37	FKEGGRG-H <sub>2</sub> O	999,56	a <sub>9</sub> -NH <sub>3</sub>
216,10	216,10	EGG-28	GGRGG-28	357,20	357,20	GGRGG-28	514,27	y <sub>6</sub> -NH <sub>3</sub>	715,35	FKEGGRG-NH <sub>3</sub>	1016,59	a <sub>9</sub>
226,08	226,08	EGG-H <sub>2</sub> O	GGRGG-NH <sub>3</sub>	368,17	368,17	GGRGG-NH <sub>3</sub>	519,26	FKEGG	717,42	b <sub>5</sub>	1026,57	b <sub>9</sub> -H <sub>2</sub> O
230,15	230,15	KE-28	KEG	372,19	372,19	KEG	528,29	KEGGR	729,42	a <sub>6</sub> -NH <sub>3</sub>	1027,55	b <sub>9</sub> -NH <sub>3</sub>
240,13	240,13	KE-H <sub>2</sub> O	EGGR-28	372,20	372,20	EGGR-28	531,30	y <sub>6</sub>	732,38	FKEGGRG	1044,58	b <sub>9</sub>
241,12	241,12	KE-NH <sub>3</sub>	FKE-28	377,22	377,22	FKE-28	533,32	RFKE-28	746,44	a <sub>6</sub>	1056,58	a <sub>10</sub> -NH <sub>3</sub>
243,16	243,16	RGG-28	EGGR-H <sub>2</sub> O	382,18	382,18	EGGR-H <sub>2</sub> O	543,30	RFKE-H <sub>2</sub> O	756,43	b <sub>6</sub> -H <sub>2</sub> O	1062,59	b <sub>9</sub> +H <sub>2</sub> O
243,16	243,16	GRG-28	EGGR-NH <sub>3</sub>	383,17	383,17	EGGR-NH <sub>3</sub>	543,35	a <sub>4</sub> -NH <sub>3</sub>	757,41	b <sub>6</sub> -NH <sub>3</sub>	1073,60	y <sub>10</sub> -H <sub>2</sub> O
243,16	243,16	GGR-28	GGRG	385,19	385,19	GGRG	544,29	RFKE-NH <sub>3</sub>	761,41	FKEGGRGG-28	1073,61	a <sub>10</sub>
244,09	244,09	EGG	FKE-H <sub>2</sub> O	387,20	387,20	FKE-H <sub>2</sub> O	557,32	KEGGRG-28	770,43	y <sub>8</sub> -H <sub>2</sub> O	1074,58	y <sub>10</sub> -NH <sub>3</sub>
244,13	244,13	y <sub>3</sub> -NH <sub>3</sub>	FKE-NH <sub>3</sub>	388,19	388,19	FKE-NH <sub>3</sub>	560,38	a <sub>4</sub>	771,39	FKEGGRGG-H <sub>2</sub> O	1083,59	b <sub>10</sub> -H <sub>2</sub> O
248,18	248,18	FK-28	EGGR	400,19	400,19	EGGR	561,31	RFKE	771,41	y <sub>8</sub> -NH <sub>3</sub>	1084,58	b <sub>10</sub> -NH <sub>3</sub>
254,12	254,12	RGG-NH <sub>3</sub>	y <sub>4</sub> -NH <sub>3</sub>	400,23	400,23	y <sub>4</sub> -NH <sub>3</sub>	567,30	KEGGRG-H <sub>2</sub> O	772,37	FKEGGRGG-NH <sub>3</sub>	1091,61	y <sub>10</sub>
254,12	254,12	GRG-NH <sub>3</sub>	RFK-28	404,28	404,28	RFK-28	568,28	KEGGRG-NH <sub>3</sub>	774,44	b <sub>6</sub>	1101,60	b <sub>10</sub>
254,12	254,12	GGR-NH <sub>3</sub>	FKE	405,21	405,21	FKE	571,35	b <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub>	786,44	a <sub>7</sub> -NH <sub>3</sub>	1102,73	b <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O-NH3
258,14	258,14	KE	RFK-NH <sub>3</sub>	415,25	415,25	RFK-NH <sub>3</sub>	585,31	KEGGRG	788,44	y <sub>8</sub>	1119,61	b <sub>10</sub> +H <sub>2</sub> O
259,14	259,14	FK-NH <sub>3</sub>	a <sub>3</sub> -NH <sub>3</sub>	415,26	415,26	a <sub>3</sub> -NH <sub>3</sub>	588,37	b <sub>4</sub>	789,40	FKEGGRGG	1247,71	M+H
261,16	261,16	y <sub>3</sub>	y <sub>4</sub>	417,26	417,26	y <sub>4</sub>	590,34	RFKEG-28	803,46	a <sub>7</sub>		



Péptido nº 2 "RRINREAERFF"

Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic		
70.07	70.07	R	270.16	b6-NH3+3	388.88	388.88	b9-NH3+3	513.28	513.28	b8+2	772.37	772.37	REAE <sup>RF</sup> -NH3
86.10	86.10	I	270.19	RI	390.73	390.73	a6-NH3+2	523.31	523.31	RIN <sup>R</sup> -NH3	780.37	780.37	y6-H2O
87.06	87.06	N	270.67	b4+2	391.18	391.18	y6-NH3+2	523.31	523.31	b4-NH3	780.46	780.46	a6-NH3
87.09	87.09	R	270.81	b7-H2O-4NH3+3	394.54	394.54	y9+3	526.25	526.25	y8-NH3+2	781.35	781.35	y6-NH3
90.07	90.07	a2-NH3+3	271.15	NR	394.56	394.56	b9+3	534.76	534.76	y8+2	789.40	789.40	REAE <sup>RF</sup>
95.74	95.74	a2+3	275.83	b6+3	395.73	395.73	b6-H2O-NH3+2	540.34	540.34	b4	797.49	797.49	a6
99.40	99.40	b2-NH3+3	276.18	RF-28	398.30	398.30	a3	540.34	540.34	RIN <sup>R</sup>	798.38	798.38	y6
100.09	100.09	R	284.50	a7-NH3+3	399.25	399.25	a6+2	556.32	556.32	INREA-28	808.45	808.45	b6-NH3
102.05	102.05	E	285.21	a2	399.69	399.69	y6+2	567.29	567.29	INREA-NH3	825.48	825.48	b6
105.07	105.07	b2+3	286.15	RE	400.19	400.19	NRE	568.82	568.82	a9-NH3+2	841.46	841.46	RINREAE-28
112.09	112.09	R	286.15	ER	400.56	400.56	b9+H2O+3	572.28	572.28	NREAE-28	841.46	841.46	INREAER-28
120.08	120.08	F	287.15	RF-NH3	404.73	404.73	b6-NH3+2	574.28	574.28	y9-2NH3+2	851.50	851.50	a7-NH3
127.76	127.76	a3-NH3+3	290.18	a7+3	405.22	405.22	ERF-28	574.31	574.31	b9-2NH3+2	852.43	852.43	RINREAE-NH3
133.44	133.44	a3+3	291.14	y4-NH3+2	409.27	409.27	b3-NH3	577.34	577.34	a9+2	852.43	852.43	INREAER-NH3
134.60	134.60	b2-NH3+2	293.84	b7-NH3+3	413.24	413.24	b6+2	581.27	581.27	y4-NH3	868.52	868.52	a7
137.09	137.09	b3-NH3+3	296.18	b2-NH3	416.19	416.19	ERF-NH3	582.79	582.79	y9-NH3+2	869.46	869.46	RINREAE
142.77	142.77	b3+3	299.51	b7+3	426.25	426.25	a7-NH3+2	582.82	582.82	b9-NH3+2	869.46	869.46	INREAER
143.11	143.11	a2+2	299.65	y4+2	426.29	426.29	b3	583.25	583.25	NREAE-NH3	875.45	875.45	NREAE <sup>RF</sup> -28
148.60	148.60	b2-NH3+2	302.13	EAE-28	428.57	428.57	a10-NH3+3	584.32	584.32	INREA	879.49	879.49	b7-NH3
157.10	157.10	b1	304.18	RF	433.22	433.22	ERF	591.31	591.31	y9+2	886.42	886.42	NREAE <sup>RF</sup> -NH3
157.11	157.11	b2+2	313.15	y2	434.25	434.25	a10+3	591.33	591.33	b9+2	896.52	896.52	b7
165.78	165.78	a4-NH3+3	313.16	y7-NH3+3	434.76	434.76	a7+2	596.28	596.28	Y4	903.44	903.44	NREAE <sup>RF</sup>
166.09	166.09	y1	313.21	y7-NH3+3	437.91	437.91	b10-NH3+3	597.28	597.28	EAE <sup>RF</sup> -2H2O	937.45	937.45	y7-NH3
171.45	171.45	a4+3	318.83	y7+3	440.25	440.25	b7-NH3+2	598.30	598.30	y4	954.48	954.48	y7
173.09	173.09	EAE-28	319.49	b8-H2O-3NH3+3	440.90	440.90	y10-NH3+3	600.27	600.27	NREAE	980.54	980.54	a8-NH3
173.09	173.09	AE-28	326.21	a5-NH3+2	443.24	443.24	NREAE-28	600.34	600.34	b9+H2O+2	988.53	988.53	INREAERF-28
175.11	175.11	b4-NH3+3	326.66	y5-NH3+2	443.58	443.58	b10+3	605.30	605.30	EAE <sup>RF</sup> -28	997.56	997.56	a8
180.78	180.78	b4+3	327.81	y8-2H2O-3NH3+3	446.57	446.57	y10+3	614.34	614.34	REAE <sup>RF</sup> -28	997.56	997.56	RINREAE <sup>RF</sup> -28
191.14	191.14	a3-NH3+2	329.19	REA-28	448.76	448.76	b7+2	616.27	616.27	EAE <sup>RF</sup> -NH3	999.50	999.50	INREAERF-NH3
199.65	199.65	a3+2	329.19	AER-28	449.58	449.58	b10-H2O+3	625.31	625.31	REAE <sup>RF</sup> -NH3	1008.53	1008.53	b8-NH3
200.14	200.14	IN-28	330.13	EAE	452.23	452.23	y3-NH3	641.38	641.38	RINRE <sup>RF</sup> -28	1008.53	1008.53	RINREAE <sup>RF</sup> -NH3
201.09	201.09	EA	331.70	b5-2NH3+2	454.20	454.20	NREA-NH3	642.36	642.36	a10-NH3+2	1016.53	1016.53	INREAERF
201.09	201.09	AE	333.19	a8+3	458.24	458.24	REAE-28	650.87	650.87	a10+2	1025.56	1025.56	RINREAE <sup>RF</sup>
205.14	205.14	b3-NH3+2	334.72	a5+2	458.24	458.24	EAE <sup>RF</sup> -28	651.42	651.42	a5-NH3	1025.56	1025.56	b8
213.65	213.65	b3+2	335.17	y5+2	469.20	469.20	REAE-NH3	652.31	652.31	y5-NH3	1051.50	1051.50	y8-NH3
217.81	217.81	a5-NH3+3	336.85	b8-NH3+3	469.20	469.20	EAE <sup>RF</sup> -NH3	652.35	652.35	RINRE-NH3	1068.52	1068.52	y8
223.49	223.49	a5+3	340.16	AER-NH3	469.23	469.23	y7-NH3+2	656.36	656.36	b10-NH3+2	1136.64	1136.64	a9-NH3
226.62	226.62	y3-NH3+2	340.21	b5-NH3+2	469.26	469.26	y3	660.84	660.84	y10-NH3+2	1144.63	1144.63	RINREAERF-28
227.14	227.14	b5-NH3+3	342.52	b8+3	471.23	471.23	NREA	664.87	664.87	b10+2	1153.67	1153.67	a9
228.13	228.13	IN	348.72	b5+2	476.26	476.26	AERF-28	668.44	668.44	a5	1155.60	1155.60	RINREAERF-NH3
232.82	232.82	b5+3	351.17	y8-NH3+3	477.74	477.74	y7+2	669.34	669.34	y5	1164.58	1164.58	y9-NH3
235.13	235.13	y3+2	356.24	INR-28	478.74	478.74	b8-H2O-3NH3+2	669.36	669.36	y10+2	1164.63	1164.63	b9-NH3
242.20	242.20	RI-28	356.24	RIN-28	479.22	479.22	INRE-2NH3	669.38	669.38	RINRE	1172.63	1172.63	RINREAERF
243.16	243.16	NR-28	356.85	y8+3	486.23	486.23	EAE <sup>RF</sup> -NH3	673.87	673.87	b10+H2O+2	1181.61	1181.61	y9
248.16	248.16	a4-NH3+2	357.19	REA	487.23	487.23	AERF-NH3	679.41	679.41	b5-NH3	1181.66	1181.66	b9
253.17	253.17	RI-NH3	357.19	AER	487.25	487.25	b8-H2O-2NH3+2	685.36	685.36	INREAE-28	1199.67	1199.67	b9+H2O
254.12	254.12	NR-NH3	367.21	INR-NH3	487.74	487.74	b8-3NH3+2	696.33	696.33	INREAE-NH3	1283.71	1283.71	a10-NH3
256.67	256.67	a4+2	367.21	RIN-NH3	490.77	490.77	a8-NH3+2	696.44	696.44	b5	1300.73	1300.73	a10
258.16	258.16	RE-28	372.20	NRE-28	492.94	492.94	M3-3E-NH3+3	712.42	712.42	RINREA-28	1311.70	1311.70	b10-NH3
258.16	258.16	ER-28	379.55	a9-NH3+3	495.32	495.32	a4-NH3	713.36	713.36	INREAE	1320.68	1320.68	y10-NH3
260.82	260.82	a6-NH3+3	381.27	a3-NH3	496.25	496.25	INRE-NH3	723.39	723.39	RINREA-NH3	1328.73	1328.73	b10
262.16	262.16	b4-NH3+2	383.17	NRE-NH3	498.61	498.61	MH+3	728.38	728.38	NREAE <sup>RF</sup> -28	1337.71	1337.71	y10
266.50	266.50	a6+3	384.24	INR	499.29	499.29	a8+2	739.35	739.35	NREAE <sup>RF</sup> -NH3	1346.74	1346.74	b10+H2O
268.19	268.19	a2-NH3	384.24	RIN	504.26	504.26	AERF	740.42	740.42	RINREA	1493.81	1493.81	M+H
269.12	269.12	RE-NH3	385.23	a9+3	504.77	504.77	b8-NH3+2	747.41	747.41	MH+2			
269.12	269.12	ER-NH3	388.86	y9-NH3+3	512.34	512.34	RINR-28	761.41	761.41	REAE <sup>RF</sup> -28			

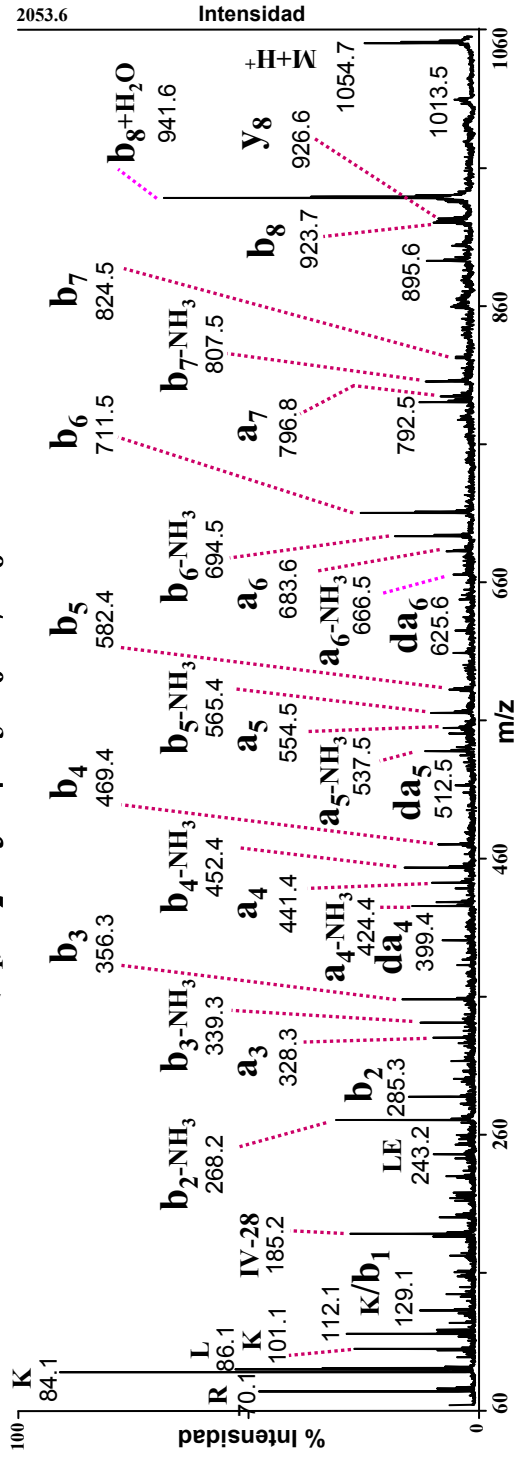
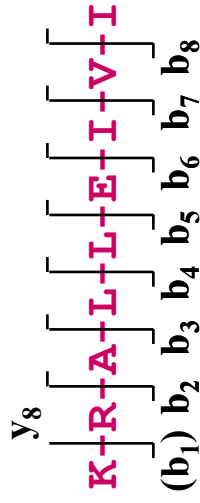




Péptido nº 3 "RRINREAERF"

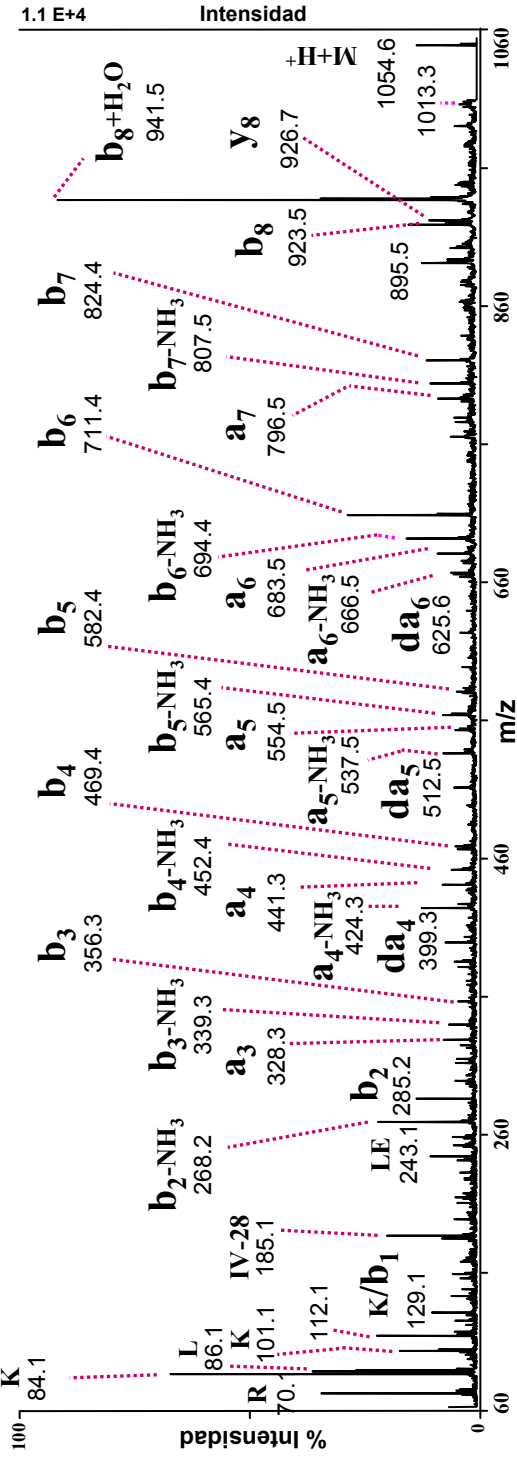
Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic
70.07	70.07	R	254.12	NR-NH3	348.53	b8+H2O+3	348.53	485.28	INRE-28	685.36	INREAE-28
86.1	86.1	I	256.67	a4+2	348.72	b5+2	348.72	486.23	REAE	696.33	INREAE-NH3
87.06	87.06	N	258.16	RE-28	356.24	RIN-28	356.24	486.23	EAER	696.44	b5
87.09	87.09	R	258.16	ER-28	356.24	INR-28	356.24	490.77	a8-NH3+2	712.42	RINREA-28
90.07	90.07	a2-NH3+3	260.82	a6-NH3+3	357.19	REA	357.19	492.23	y8-3NH3+2	713.36	INREAE
95.74	95.74	a2+3	261.64	y4+2	357.19	AER	357.19	495.32	a4-NH3	723.39	RINREA-NH3
99.4	99.4	b2-NH3+3	262.16	b4-NH3+2	367.21	INR-NH3	367.21	496.25	INRE-NH3	728.38	NREAE-28
100.09	100.09	R	264.13	y6-NH3+3	367.21	RIN-NH3	367.21	499.29	a8+2	739.35	NREAE-28
102.05	102.05	E	266.5	a6+3	372.2	NRE-28	372.2	504.77	b8-NH3+2	740.42	RINREA
105.07	105.07	b2+3	268.19	a2-NH3	379.55	a9-NH3+3	379.55	505.24	y4-NH3	756.37	NREAE-28
112.09	112.09	R	269.12	RE-NH3	381.27	a3-NH3	381.27	509.26	y8-NH3+2	780.46	a6-NH3
120.08	120.08	F	269.12	ER-NH3	383.17	NRE-NH3	383.17	512.34	RINR-28	790.38	y6-NH3
127.76	127.76	a3-NH3+3	269.81	y6+3	384.24	INR	384.24	512.34	a4	797.49	a6
133.44	133.44	a3+3	270.16	b6-NH3+3	384.24	RIN	384.24	513.28	INRE	807.41	y6
134.6	134.6	a2-NH3+2	270.19	RI	385.23	a9+3	385.23	513.28	b8+2	808.45	b6-NH3
137.09	137.09	b3-NH3+3	270.67	b4+2	388.88	b9-NH3+3	388.88	517.77	y8+2	825.48	b6
142.77	142.77	b3+3	271.15	NR	390.73	a6-NH3+2	390.73	522.27	y4	841.46	RINREAE-28
143.11	143.11	a2+2	275.83	b6+3	391.88	y9-NH3+3	391.88	522.29	b8+H2O+2	841.46	INREAE-28
148.6	148.6	b2-NH3+2	284.5	a7-NH3+3	394.56	b9+3	394.56	523.31	RINR-NH3	851.5	a7-NH3
153.08	153.08	y2-NH3+2	285.21	a2	395.2	y6-H2O+2	395.2	523.31	b4-NH3	852.43	RINREAE-NH3
157.11	157.11	b2+2	286.15	RE	397.55	y9+3	397.55	540.34	b4	852.43	INREAE-NH3
161.6	161.6	y2+2	286.15	ER	398.3	a3	398.3	540.34	RINR	868.52	a7
165.78	165.78	a4-NH3+3	290.18	a7+3	399.25	a6+2	399.25	556.32	INREA-28	869.46	RINREAE
166.09	166.09	y1	293.84	b7-NH3+3	400.19	NRE	400.19	567.29	INREA-NH3	869.46	INREAE-28
171.45	171.45	a4+3	296.18	b2-NH3	400.56	b9+H2O+3	400.56	568.82	a9-NH3+2	879.49	b7-NH3
173.09	173.09	E-A-28	299.51	b7+3	404.21	y6+2	404.21	572.28	NREAE-28	896.52	b7
173.09	173.09	AE-28	302.13	EAE-28	404.73	b6-NH3+2	404.73	577.34	a9+2	904.43	y7-NH3
175.11	175.11	b4-NH3+3	302.15	y7-NH3+3	409.27	b3-NH3	409.27	582.82	b9-NH3+2	921.45	y7
180.78	180.78	b4+3	305.16	y2-NH3	413.24	b6+2	413.24	583.25	NREAE-NH3	980.54	a8-NH3
191.14	191.14	a3-NH3+2	307.82	y7+3	426.25	a7-NH3+2	426.25	584.32	INREA	990.52	b8-H2O-NH3
199.65	199.65	a3+2	313.21	b2	426.29	b3	426.29	587.31	y9-NH3+2	997.56	a8
200.14	200.14	IN-28	317.65	y5-NH3+2	434.2	y3-NH3	434.2	591.33	b9+2	997.56	RINREAE-28
201.09	201.09	E-A	322.19	y2	434.76	a7+2	434.76	595.82	y9+2	1008.53	b8-NH3
201.09	201.09	AE	326.16	y5+2	435.69	y7-3NH3+2	435.69	600.27	NREAE	1008.53	RINREAE-NH3
205.14	205.14	b3-NH3+2	326.21	a5-NH3+2	440.25	b7-NH3+2	440.25	600.34	b9+H2O+2	1017.51	y8-NH3
213.65	213.65	b3+2	327.52	a8-NH3+3	443.24	NREA-28	443.24	614.34	REAER-28	1025.56	RINREAE-28
217.61	217.61	y3-NH3+2	329.19	REA-28	443.89	M+3H-NH3+3	443.89	625.31	REAER-NH3	1025.56	b8
217.81	217.81	a5-NH3+3	329.19	AER-28	448.76	b7+2	448.76	633.3	y5-H2O	1034.54	y8
223.49	223.49	a5+3	330.13	EAE	449.58	MH+3	449.58	634.28	y5-NH3	1043.57	b8+H2O
226.12	226.12	y3+2	333.19	a8+3	451.23	y3	451.23	641.38	RINRE-28	1136.64	a9-NH3
227.14	227.14	b5-NH3+3	334.72	a5+2	452.72	y7-NH3+2	452.72	642.33	REAER	1153.67	a9
228.13	228.13	IN	336.85	b8-NH3+3	454.2	NREA-NH3	454.2	651.31	y5	1164.63	b9-NH3
232.82	232.82	b5+3	339.84	y8-NH3+3	458.24	REA-E-28	458.24	651.42	a5-NH3	1173.61	y9-NH3
242.2	242.2	RI-28	340.16	REA-NH3	458.24	EAER-28	458.24	652.35	RINRE-NH3	1181.66	b9
243.16	243.16	NR-28	340.16	AER-NH3	461.23	y7+2	461.23	668.44	a5	1190.64	y9
248.16	248.16	a4-NH3+2	340.21	b5-NH3+2	469.2	REA-E-NH3	469.2	669.38	RINRE	1199.67	b9+H2O
253.12	253.12	y4-NH3+2	342.52	b8+3	469.2	EAER-NH3	469.2	673.87	MH+2	1346.74	M+H
253.17	253.17	RI-NH3	345.52	y8+3	471.23	NREA	471.23	679.41	b5-NH3		

A



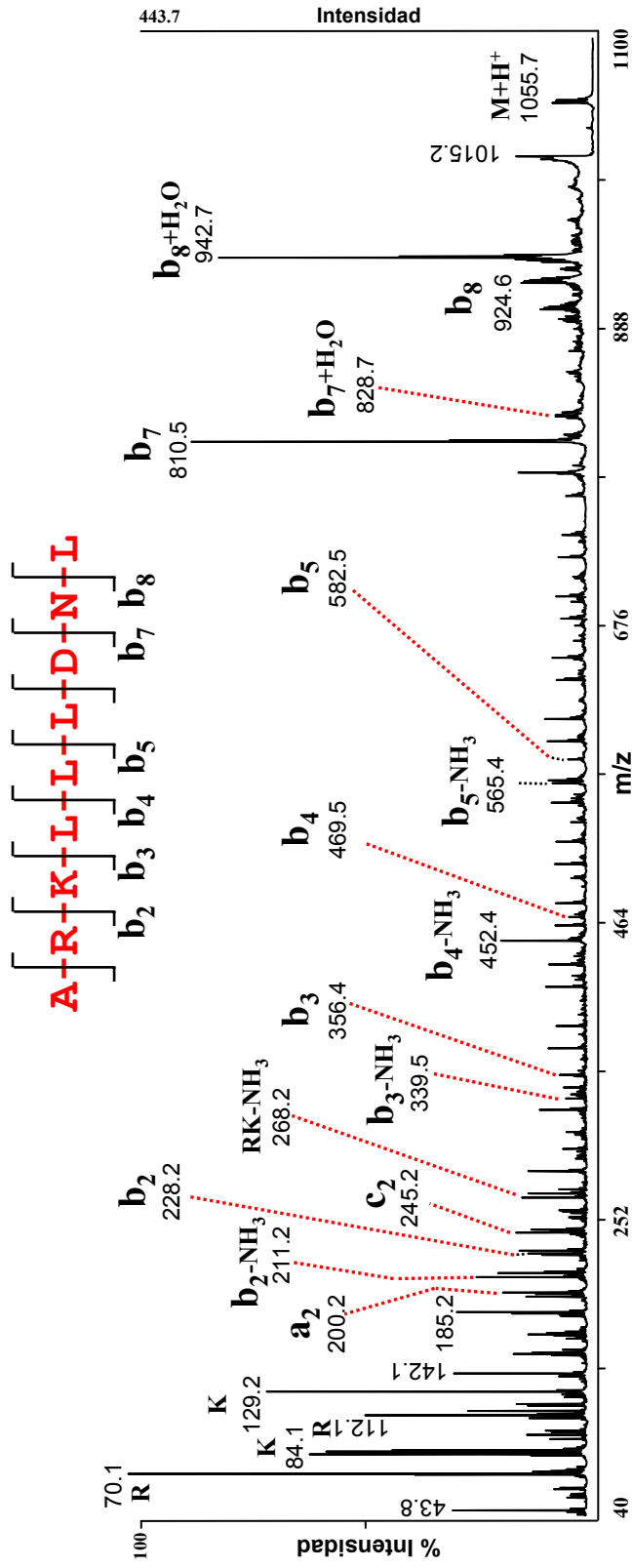
B

KRALLEIVI Sintético

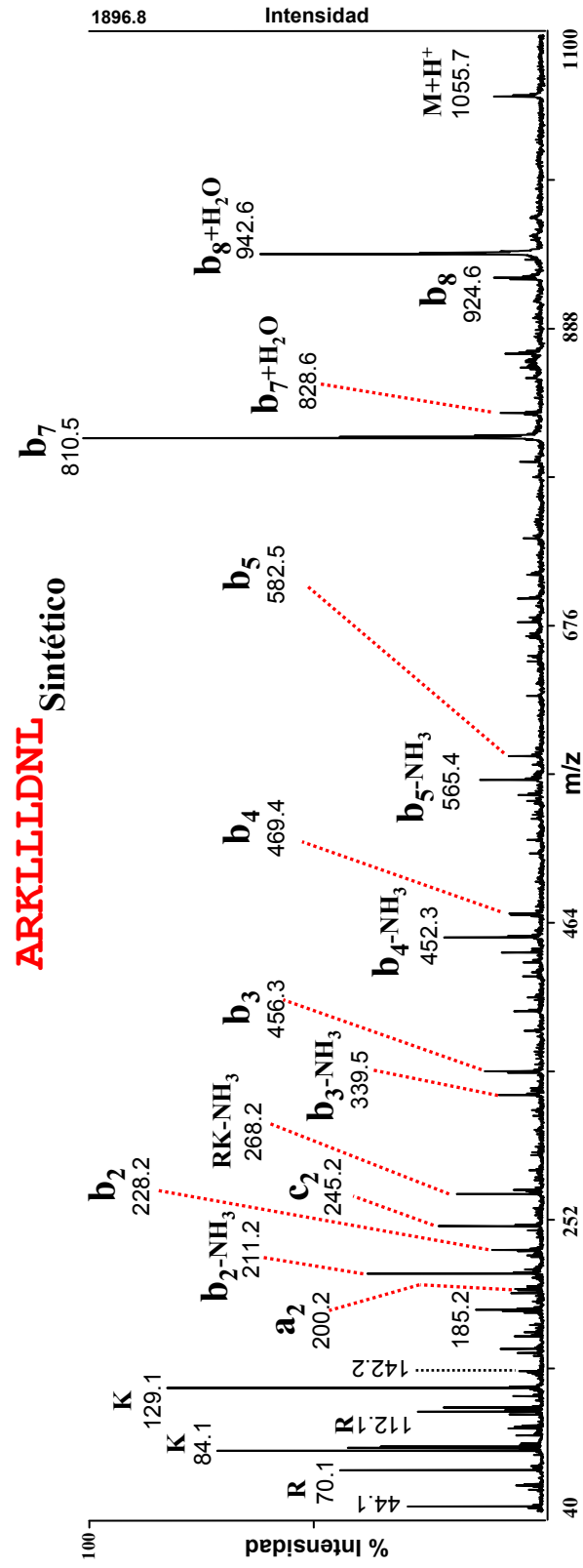




**A**



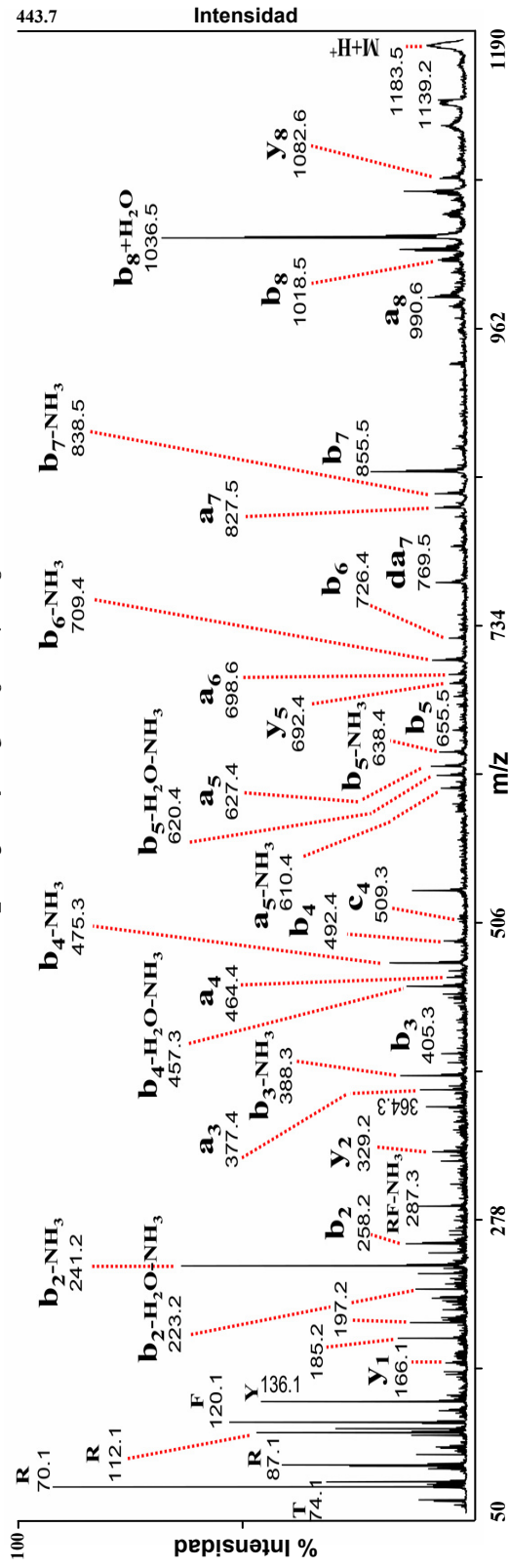
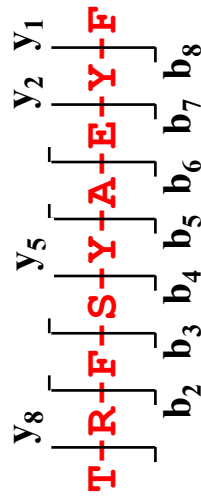
**B**



Péptido nº 5 "ARKLLLDNL"

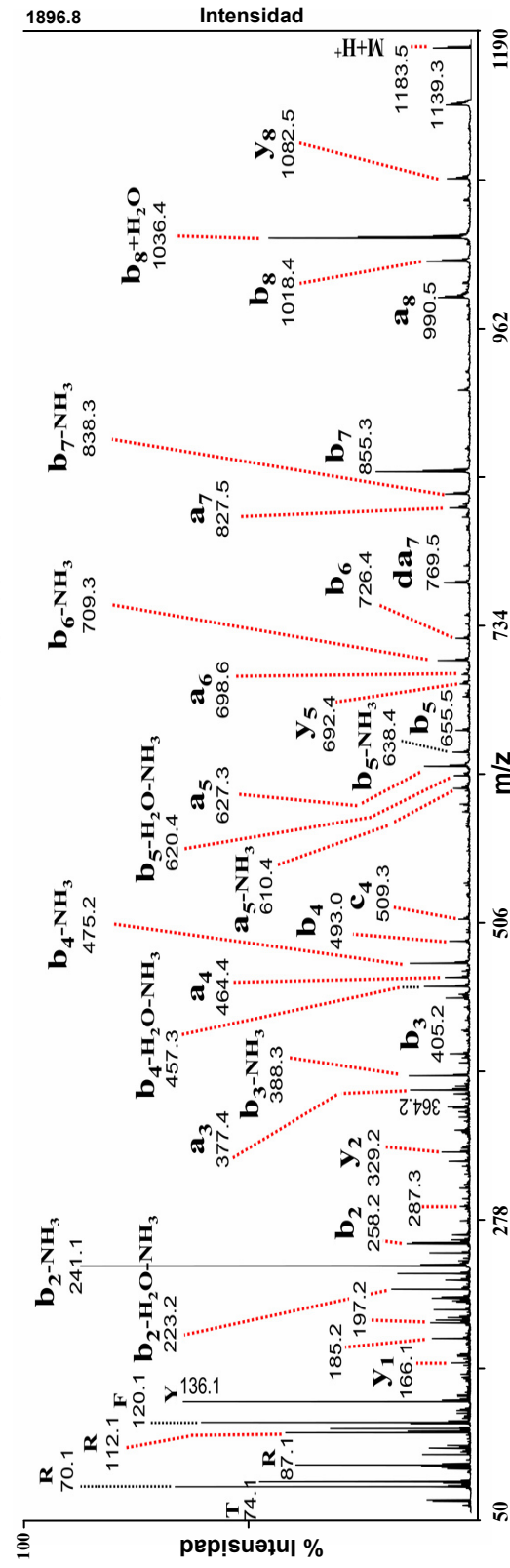
Bacterial peptide		Synthetic		Bacterial peptide		Synthetic		Bacterial peptide		Synthetic		Bacterial peptide		Synthetic	
70.1	70.1	R	314.2	LLD-28	469.3	b4	469.3	469.3	b4	667.5	a6	828.5	828.5	cladder7	
84.1	84.1	K	315.2	LDN-28	472.2	Y4	472.2	472.2	Y4	669.4		828.7	828.7	b7+H2O	
86.1	86.1	L	322.2	b3-2NH3	474.3	ncladder4	474.3	474.3		678.5	b6-NH3	835.5	835.5	RKLLLDN-H2O	
87.1	87.1	N	324.2	LLD-H2O	474.3	y4	474.3	474.3	y4	679.4	KLLLDN-H2O	836.5	836.5	RKLLLDN-NH3	
87.1	87.1	R	325.2	LDN-H2O	477.3		477.3	477.3	RKLL-2NH3	680.4	KLLLDN-NH3	845.5	845.5	a8-3NH3	
88.0	88.0	D	326.1	y3-H2O-NH3	483.4		483.4	483.4	RKLL-28	682.4	y6-H2O	853.5	853.5	RKLLLDN	
100.1	100.1	R	326.1	LDN-NH3	485.3	e-14	485.3	485.3	c-14	683.4	y6-NH3	853.6	853.6	da8	
101.1	101.1	K	327.3	KLL-28	486.4	e4	486.4	486.4		684.4	z6	854.5	854.5	x7	
112.1	112.1	R	328.2	a3	487.3	cladder4	487.3	487.3		685.4	z+H6	855.5	855.5	b8-H2O-3NH3	
116.1	116.1	z1	338.2	KLL-NH3	494.3	RKLL-NH3	494.3	494.3		687.4	RKLLLD-H2O-2NH3	862.5	862.5	a8-2NH3	
117.1	117.1	z+H1	339.2	b3-NH3	500.2	x4	500.2	500.2	x4	695.5	b6	872.5	872.5	b8-H2O-2NH3	
126.1	126.1	K	340.3	LLL	511.4		511.4	511.4		697.4	KLLLDN	873.5	873.5	b8-3NH3	
129.1	129.1	K	342.2	LLD	512.4	da5	512.4	512.4		698.4	Y6	879.5	879.5	a8-NH3	
130.1	130.1	Y1	343.2	y3-H2O	520.4	a5-2NH3	520.4	520.4		700.4	y6	882.5	882.5	wa8	
132.1	132.1	ncladder1	343.2	LDN	534.3	LLLDN-H2O-NH3	534.3	534.3		700.4	ncladder6	883.5	883.5	y8	
132.1	132.1	y1	344.1	y3-NH3	537.4	a5-NH3	537.4	537.4		704.4	704.4	889.5	889.5	b8-H2O-NH3	
158.1	158.1	x1	345.2	z3	541.3	LLLDN-28	541.3	541.3		705.4	705.4	890.5	890.5	b8-2NH3	
183.1	183.1	a2-NH3	346.2	z+H3	548.3	KLLLD-H2O-NH3	548.3	548.3		711.5	711.5	896.6	896.6	a8	
195.0	195.0	DN-H2O-NH3	355.3	KLL	548.4	b5-2NH3	548.4	548.4		711.5	c-16	906.6	906.6	b8-H2O	
199.2	199.2	LL-28	356.2	b3	551.3	LLLDN-H2O	551.3	551.3		712.5	c6	907.5	907.5	b8-NH3	
200.2	200.2	a2	359.2	Y3	552.3		552.3	552.3		713.5	cladder6	915.5	915.5	y8-H2O-3NH3	
201.1	201.1	LD-28	361.2	y3	552.3	y5-H2O-NH3	552.3	552.3		713.5		924.6	924.6	b8	
202.1	202.1	DN-28	361.2	ncladder3	554.4	LLLDN-NH3	554.4	554.4		721.5	721.5	932.6	932.6	y8-H2O-2NH3	
211.1	211.1	LD-H2O	364.2	RK1-2NH3	555.4	a5	555.4	555.4		722.5	722.5	933.5	933.5	y8-3NH3	
211.1	211.1	b2-NH3	370.3	RKL-28	565.4	KLLLD-28	565.4	565.4		726.4	x6	940.6	940.6	c-18	
212.1	212.1	DN-H2O	372.3	c-13	565.4	KLLLD-H2O	565.4	565.4		738.5	da7	941.6	941.6	c8	
213.1	213.1	DN-NH3	373.3	c3	566.4	b5-NH3	566.4	566.4		739.5	739.5	942.6	942.6	cladder8	
214.2	214.2	KL-28	374.3	cladder3	569.3	LLLDN	569.3	569.3		748.5	a7-2NH3	942.6	942.6	b8+H2O	
225.2	225.2	KL-NH3	381.3	RKL-NH3	569.3	y5-H2O	569.3	569.3		758.5	a7-H2O-2NH3	949.6	949.6	y8-H2O-NH3	
227.2	227.2	LL	387.2	x3	570.3	y5-NH3	570.3	570.3		765.5	a7-NH3	950.6	950.6	y8-2NH3	
228.1	228.1	b2	398.3	RKL	571.3	z5	571.3	571.3		775.5	y7-H2O-NH3	955.6	955.6	m2	
229.1	229.1	y2-NH3	399.3	da4	572.3	z+H5	572.3	572.3		776.5	b7-2NH3	966.6	966.6	y8-H2O	
229.1	229.1	LD	407.3	a4-2NH3	582.4	b5	582.4	582.4		776.5	a7	967.6	967.6	y8-NH3	
230.1	230.1	DN	421.2	LLDN-H2O-NH3	583.4	KLLLD	583.4	583.4		782.5	782.5	967.6	967.6	da9	
230.1	230.1	z2	424.3	a4-NH3	585.3	Y5	585.3	585.3		784.4	784.4	967.6	967.6	z8	
231.1	231.1	z+H2	427.3	LLLD-28	587.3	y5	587.3	587.3		792.5	b7-H2O	968.6	968.6	z+18	
242.2	242.2	KL	428.3	LLDN-28	587.3	ncladder5	587.3	587.3		793.5	y7-H2O-NH3	982.6	982.6	Y8	
244.1	244.1	Y2	435.3	b4-2NH3	590.4	RKLL-2NH3	590.4	590.4		793.5	b7-NH3	982.6	982.6	m3	
244.2	244.2	c-12	437.3	LLLD-H2O	596.5	RKLL-28	596.5	596.5		794.5	y7-2NH3	983.6	983.6	y8	
245.2	245.2	c2	438.2	LLDN-H2O	598.4	c-15	598.4	598.4		801.5	801.5	984.6	984.6	ncladder8	
246.1	246.1	y2	439.2	y4-H2O-NH3	599.4	c5	599.4	599.4		802.4	802.4	984.6	984.6	m7	
246.1	246.1	ncladder2	439.2	LLDN-NH3	600.4	cladder5	600.4	600.4		810.5	y7-H2O	996.6	996.6	m8	
246.2	246.2	cladder2	440.4	KLL-28	607.4	RKLL-NH3	607.4	607.4		810.5	b7	997.6	997.6	m9	
251.2	251.2	RK-2NH3	441.3	a4	613.3	x5	613.3	613.3		811.5	y7-NH3	998.6	998.6	m6	
257.2	257.2	RK-28	451.3	KLL-NH3	624.5	RKLL	624.5	624.5		812.5	z7	998.6	998.6	m6	
268.2	268.2	RK-NH3	452.3	b4-NH3	624.5	da6	624.5	624.5		813.5	z+17	998.6	998.6	m5	
271.2	271.2	da3	455.3	LLLD	633.4	a6-2NH3	633.4	633.4		815.5	815.5	998.6	998.6	m4	
272.1	272.1	x2	456.2	LLDN	645.4	KLKLLLDN-H2O-NH3	645.4	645.4		819.5	819.5	1010.6	1010.6	x8	
285.2	285.2	RK	456.2	y4-H2O	650.5	a6-NH3	650.5	650.5		825.5	825.5	1037.6	1037.6	MH-H2O	
294.2	294.2	a3-2NH3	457.2	y4-NH3	661.4	b6-2NH3	661.4	661.4		826.5	Y7	1038.6	1038.6	MH-NH3	
308.1	308.1	LDN-H2O-NH3	458.2	z4	662.4	KLLLDN-H2O-NH3	662.4	662.4		826.5	c-17	1039.6	1039.6	y9	
311.2	311.2	a3-NH3	459.2	z+H4	663.4	KLLLDN-2NH3	663.4	663.4		827.5	c7	1040.6	1040.6	m1	
312.3	312.3	LLL-28	468.4	KLL	665.4	y6-H2O-NH3	665.4	665.4		828.5	ncladder7	1055.7	1055.7	M+H	

A



B

TRFSYAEYF Sintético



**Péptido n° 6 "TRFSYAEYF"**

Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic	Bacterial peptide	Synthetic			
60.0	60.0	S		336.2	336.2	YAE-28	510.3	cladder4	701.3	701.3	RFSYAE-2H2O-NH3	910.4	910.4	z7
70.1	70.1	R		346.1	346.1	YAE-H2O	511.2	y4-H2O	708.3	708.3	b6-H2O	911.4	911.4	z17
74.1	74.1	T		346.1	346.1	AEY-H2O	513.2	z4	709.3	709.3	b6-NH3	917.4	917.4	RFSYAEY
87.1	87.1	R		355.1	355.1	x2	514.2	z+14	718.3	718.3	x5	924.4	924.4	Y7
100.1	100.1	R		356.2	356.2	RFS-H2O-NH3	519.2	RFSY-H2O-NH3	718.3	718.3	RFSYAE-2H2O	926.4	926.4	y7
102.1	102.1	E		360.2	360.2	a3-NH3	526.3	RFSY-28	719.3	719.3	RFSYAE-H2O-NH3	926.4	926.4	n1adder7
112.1	112.1	R		363.2	363.2	RFS-28	527.2	Y4	725.3	725.3	RFSYAEY-2H2O	947.4	947.4	b8-3H2O-NH3
120.1	120.1	F		364.2	364.2	AEY	527.2	YAEY	726.4	726.4	b6	952.4	952.4	x7
136.1	136.1	Y		364.2	364.2	YAE	529.2	y4	726.4	726.4	RFSYAE-28	964.4	964.4	b8-3H2O
150.1	150.1	z1		370.2	370.2	FSY-28	529.2	n1adder4	733.3	733.3	FSYAEY-28	965.4	965.4	b8-2H2O-NH3
151.1	151.1	z+11		370.2	370.2	b3-H2O-NH3	536.3	RFSY-H2O	736.3	736.3	RFSYAE-H2O	973.4	973.4	a8-NH3
164.1	164.1	Y1		373.2	373.2	RFS-H2O	537.2	RFSY-NH3	737.3	737.3	RFSYAE-NH3	982.4	982.4	b8-2H2O
166.1	166.1	y1		374.2	374.2	RFS-NH3	554.3	RFSY	742.4	742.4	c-16	983.4	983.4	b8-H2O-NH3
166.1	166.1	n1adder1		377.2	377.2	a3	555.2	x4	743.3	743.3	FSYAEY-H2O	990.5	990.5	a8
173.1	173.1	AE-28		380.2	380.2	FSY-H2O	562.2	FSYAE-2H2O	743.3	743.3	y6-2H2O	1000.5	1000.5	b8-H2O
183.1	183.1	AE-H2O		387.2	387.2	b3-H2O	570.3	FSYAE-28	743.4	743.4	c6	1001.4	1001.4	b8-NH3
192.1	192.1	x1		388.2	388.2	b3-NH3	578.2	SYAEY-2H2O	744.4	744.4	cladder6	1018.5	1018.5	b8
201.1	201.1	AE		391.2	391.2	RFS	580.2	FSYAE-H2O	754.4	754.4	RFSYAE	1029.4	1029.4	y8-2H2O-NH3
207.1	207.1	YA-28		398.2	398.2	FSY	586.3	SYAEY-28	761.3	761.3	FSYAEY	1034.5	1034.5	c-18
207.1	207.1	FS-28		405.2	405.2	b3	590.3	RFSYA-H2O-NH3	761.3	761.3	y6-H2O	1035.5	1035.5	c8
213.1	213.1	a2-NH3		415.2	415.2	SYAE-2H2O	596.2	SYAEY-H2O	763.3	763.3	z6	1036.5	1036.5	b8+H2O
217.1	217.1	FS-H2O		421.2	421.2	c-13	597.3	RFSYA-28	764.3	764.3	z+16	1036.5	1036.5	cladder8
223.1	223.1	b2-H2O-NH3		422.3	422.3	c3	598.3	FSYAE	769.4	769.4	da7	1046.5	1046.5	y8-2H2O
230.2	230.2	a2		423.2	423.2	SYAE-28	602.3	b5-2H2O-NH3	777.3	777.3	Y6	1047.5	1047.5	y8-H2O-NH3
233.1	233.1	SY-H2O		423.2	423.2	cladder3	607.3	RFSYA-H2O	779.3	779.3	n1adder6	1064.5	1064.5	y8-H2O
235.1	235.1	YA		433.2	433.2	SYAE-H2O	608.3	RFSYA-NH3	779.3	779.3	y6	1065.5	1065.5	y8-NH3
235.1	235.1	FS		439.2	439.2	b4-2H2O-NH3	610.3	a5-NH3	784.3	784.3	b7-3H2O-NH3	1066.5	1066.5	z8
240.1	240.1	b2-H2O		440.2	440.2	y3-H2O	614.2	SYAEY	801.4	801.4	b7-3H2O	1067.5	1067.5	z+18
241.1	241.1	b2-NH3		441.2	441.2	FSYA-28	619.3	b5-2H2O	802.4	802.4	b7-2H2O-NH3	1076.5	1076.5	m5
251.1	251.1	SY		442.2	442.2	z3	620.3	b5-H2O-NH3	805.3	805.3	x6	1076.5	1076.5	m8
258.2	258.2	b2		443.2	443.2	z+13	625.3	RFSYA	810.4	810.4	a7-NH3	1080.5	1080.5	Y8
265.1	265.1	EY-28		447.2	447.2	a4-NH3	627.3	a5	819.4	819.4	b7-2H2O	1082.5	1082.5	y8
274.2	274.2	c-12		448.3	448.3	da4	637.3	b5-H2O	820.4	820.4	b7-H2O-NH3	1082.5	1082.5	n1adder8
275.1	275.1	EY-H2O		451.2	451.2	SYAE	638.3	b5-NH3	827.4	827.4	a7	1083.5	1083.5	m2
275.2	275.2	c2		451.2	451.2	FSYA-H2O	655.3	b5	837.4	837.4	b7-H2O	1092.5	1092.5	m9
276.2	276.2	cladder2		456.2	456.2	Y3	671.3	c-15	838.4	838.4	b7-NH3	1092.5	1092.5	m3
276.2	276.2	RF-28		456.2	456.2	b4-2H2O	672.3	c5	855.4	855.4	b7	1108.5	1108.5	x8
287.2	287.2	RF-NH3		457.2	457.2	b4-H2O-NH3	673.3	b6-2H2O-NH3	864.4	864.4	RFSYAEY-2H2O-NH3	1110.5	1110.5	m7
293.1	293.1	EY		458.2	458.2	n1adder3	673.3	cladder5	871.4	871.4	c-17	1137.5	1137.5	v9
294.1	294.1	SYA-28		458.2	458.2	y3	674.3	y5-H2O	872.4	872.4	c7	1138.5	1138.5	m1
304.1	304.1	SYA-H2O		464.3	464.3	a4	676.3	z5	873.4	873.4	cladder7	1150.5	1150.5	wa9
304.2	304.2	RF		469.2	469.2	FSYA	677.3	z+15	873.4	873.4	b7+H2O	1152.5	1152.5	wb9
313.1	313.1	z2		474.2	474.2	b4-H2O	681.3	a6-NH3	881.4	881.4	RFSYAEY-2H2O	1152.5	1152.5	m4
314.1	314.1	z+12		475.2	475.2	b4-NH3	690.3	Y5	882.4	882.4	RFSYAEY-H2O-NH3	1165.5	1165.5	MH-H2O
322.1	322.1	SYA		484.2	484.2	x3	690.3	b6-2H2O	889.4	889.4	RFSYAEY-28	1166.5	1166.5	MH-NH3
327.1	327.1	Y2		492.3	492.3	b4	691.3	b6-H2O-NH3	890.4	890.4	y7-2H2O	1168.5	1168.5	m6
329.1	329.1	y2		499.2	499.2	YAEY-28	692.3	n1adder5	899.4	899.4	RFSYAEY-H2O	1183.5	1183.5	M+H
329.1	329.1	n1adder2		508.3	508.3	c-14	693.4	y5	900.4	900.4	RFSYAEY-NH3			
336.2	336.2	AEY-28		509.3	509.3	c4	698.4	a6	908.4	908.4	y7-H2O			



Publicaciones generadas durante el  
período de elaboración de esta tesis

## *Anexo II*



## Publicaciones generadas durante el período de elaboración de esta tesis

Marcilla M, **Cragolini JJ**, López de Castro JA.

Proteasome-independent HLA-B27 ligands arise mainly from small basic proteins.

*Molecular and Cellular Proteomics*. **2007** May;6(5):923-38.

**Cragolini JJ** and López de Castro JA.

Identification of endogenously presented peptides from *Chlamydia trachomatis* with high homology to human proteins and to a natural self-ligand of HLA-B27.

*Molecular and Cellular Proteomics*. **2008** Jan;7(1):170-80.

**Cragolini JJ**, Garcia-Medel N, López de Castro JA.

Endogenous processing and presentation of T-cell epitopes from *Chlamydia trachomatis* with relevance in HLA-B27-associated Reactive Arthritis.

**2009**. *Enviado*.



# Proteasome-independent HLA-B27 Ligands Arise Mainly from Small Basic Proteins\*<sup>§</sup>

Miguel Marcilla, Juan J. Cragnolini, and José A. López de Castro<sup>‡</sup>

Many of the constitutive peptide ligands of HLA-B27, a molecule strongly associated with spondyloarthritis, are proteasome-independent. Stable isotope tagging, mass spectrometry, and epoxomicin-mediated inhibition were used to determine their percentage, structural features, and parental proteins. Of 104 molecular species examined, 29.8% were proteasome-independent, paralleling the level of HLA-B27 re-expression in the presence of epoxomicin after acid stripping. Proteasome-dependent and -independent ligands differed little in peptide motifs, flanking sequences, and cellular localization of the parental proteins. In contrast, whereas the former set arose from proteins whose size and isoelectric point distribution largely reflected those in the human proteome, proteasome-independent ligands, other than a few matching signal sequences, were almost totally derived from small (about 6–16.5 kDa) and basic proteins, which account for only 6.6% of the human proteome. Thus, a non-proteasomal proteolytic pathway with strong preference for small proteins is responsible for a significant fraction of the HLA-B27-bound peptide repertoire. *Molecular & Cellular Proteomics* 6:923–938, 2007.

Major histocompatibility complex (MHC)<sup>1</sup> class I molecules constitutively bind large peptide repertoires arising from degradation of endogenous proteins and present them at the cell surface. Most of these ligands are produced in the cytosol. They or their immediate precursors are introduced into the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) by the transporter associated with antigen processing (TAP) where they bind to the nascent class I molecule in a process of assisted loading involving calreticulin, ERp57, protein-disulfide isomerase, and tapasin, which together with TAP and the MHC molecule form the peptide-loading complex (1–6). The properly folded MHC-

peptide complexes migrate to the cell surface. The class I-bound peptide repertoires consist of several thousands of molecular species (7, 8), which arise from a broad spectrum of proteins from essentially all cell compartments (9, 10). The proteasome, a multicatalytic complex of the cytosol and nucleus, is the major protease involved in the generation of MHC class I ligands (11, 12). Although the proteasome might directly generate some of these ligands (13–16), it seems that many require further processing of proteasomal products by the cytosolic protease tripeptidyl-peptidase II (TPPII) and by amino peptidases of the cytosol and ER (12, 17–21).

Some MHC class I ligands can be generated by proteases other than the proteasome (22, 23). Peptides coming from signal sequences of proteins resident in or entering the ER to be incorporated into the exocytic route are paradigmatic. These signal sequences are cleaved by the signal peptide peptidase and can be further processed in the ER, generating TAP-independent ligands (24, 25), or in the cytosol, becoming TAP-dependent (26, 27). Generation of TAP-independent ligands other than those derived from signal sequences, involving processing in the ER, has been reported (28). Besides participating in peptide trimming (18, 20), TPPII can generate some viral epitopes (29, 30). In dendritic cells, the lysosomal enzyme cathepsin S was shown to generate a TAP-independent class I ligand for cross-presentation *in vivo* (31). Furine, a protease of the Golgi, can also generate class I ligands (32–34). This enzyme, or closely related proprotein convertases, may also provide suitable class I ligands upon failure of quality control mechanisms for peptide loading in the ER (35), although the actual contribution of this enzyme to the constitutive MHC class I-bound peptide repertoires in cells with an intact processing-loading pathway has not yet been confirmed. These findings do not challenge the general rule that the proteasome pathway is the major source of MHC class I ligands. This is despite the fact that a very substantial degradation of cellular proteins, especially those with long half-lives, takes place in lysosomes (36). Thus, it is assumed that peptide transfer from the lysosomal compartment to the MHC class I presentation pathway must be very inefficient. Furthermore a major source of MHC class I ligands consists of newly synthesized polypeptides that fail to reach the native state and are targeted to the proteasome for degradation (37–39) rather than proteins that are degraded at the end of their lives.

Despite the global significance of the proteasome pathway, MHC class I allotypes differ widely in the amount of proteasome-dependent ligands that they present (40). A previous study

From the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain

Received, August 9, 2006, and in revised form, October 3, 2006  
Published, MCP Papers in Press, February 16, 2007, DOI 10.1074/mcp.M600302-MCP200

<sup>1</sup> The abbreviations used are: MHC, major histocompatibility complex; ER, endoplasmic reticulum; TAP, transporter associated with antigen processing; TPPII, tripeptidyl-peptidase II; mAb, monoclonal antibody; MG132, carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal; BFA, brefeldin A; LDH, lactate dehydrogenase; HLA, human leukocyte antigen.

addressed this issue by means of acid stripping of the class I molecules expressed at the cell surface and quantification of their re-expression in the presence of proteasome inhibitors (23). Some class I molecules were poorly re-expressed upon proteasome inhibition, whereas others, in particular B\*2705, were expressed to a substantial extent. Sequencing of peptides re-expressed in the presence of proteasome inhibitors from HLA-B27 and other class I molecules failed to reveal any obvious bias in the C-terminal peptide motifs or in the parental proteins.

The high surface re-expression of HLA-B27 in the presence of proteasome inhibitors after acid stripping (23) was convincing evidence for a significant contribution of proteasome-independent pathways to shaping the HLA-B27-bound peptide repertoire. However, a limitation of this approach is that quantitative removal of HLA class I-bound peptides by acid washing can only be indirectly assessed by flow cytometry, and it is difficult to rule out that a small amount of peptides may resist acid removal, especially in HLA-B27 whose association with  $\beta_2$ -microglobulin is particularly strong (41, 42). This might complicate the assignment of proteasome inhibitor-resistant ligands among those sequenced from acid-washed cells.

To circumvent this problem and to re-examine the nature of proteasome-independent HLA-B27 ligands, we envisaged a different approach that was independent of the previous removal of surface-expressed peptides. This approach, which used techniques of quantitative expression proteomics (43) that were recently applied to identifying MHC ligands (44, 45), was based on metabolic labeling of cellular proteins with [ $^{15}\text{N}$ ]Arg (46). This method allows the labeling of virtually all HLA-B27 ligands because Arg at P2 is a nearly universal motif of B27-bound peptides (10, 47). Upon labeling with [ $^{15}\text{N}$ ]Arg the mass spectrum of a peptide will show a selective increase in the intensity of the peak corresponding to the monoisotopic mass of the peptide plus 2 Da per Arg residue, according to the two  $^{15}\text{N}$  atoms of the labeled Arg side chain. Labeling HLA-B27-positive cells with [ $^{15}\text{N}$ ]Arg in the presence or absence of epoxomicin, a specific and potent proteasome inhibitor, provided a sensitive and reliable method to unambiguously distinguish proteasome-dependent and -independent HLA-B27 ligands. Using this approach in conjunction with MS-based peptide sequencing, it was possible to reveal a clear-cut differential distribution of proteasome-dependent and -independent ligands, depending on features of their parental proteins.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Lines, Monoclonal Antibodies (mAbs), and Inhibitors**—C1R is a human lymphoid cell line with low expression of its endogenous HLA class I molecules (48). C1R-B\*2705 transfectants were described elsewhere (49). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS (both from Invitrogen). The mAb ME1 (IgG1; specific for HLA-B27, -B7, and -B22) (50) and W6/32 (IgG2a; specific for a monomorphic HLA class I determinant) (51) were used.

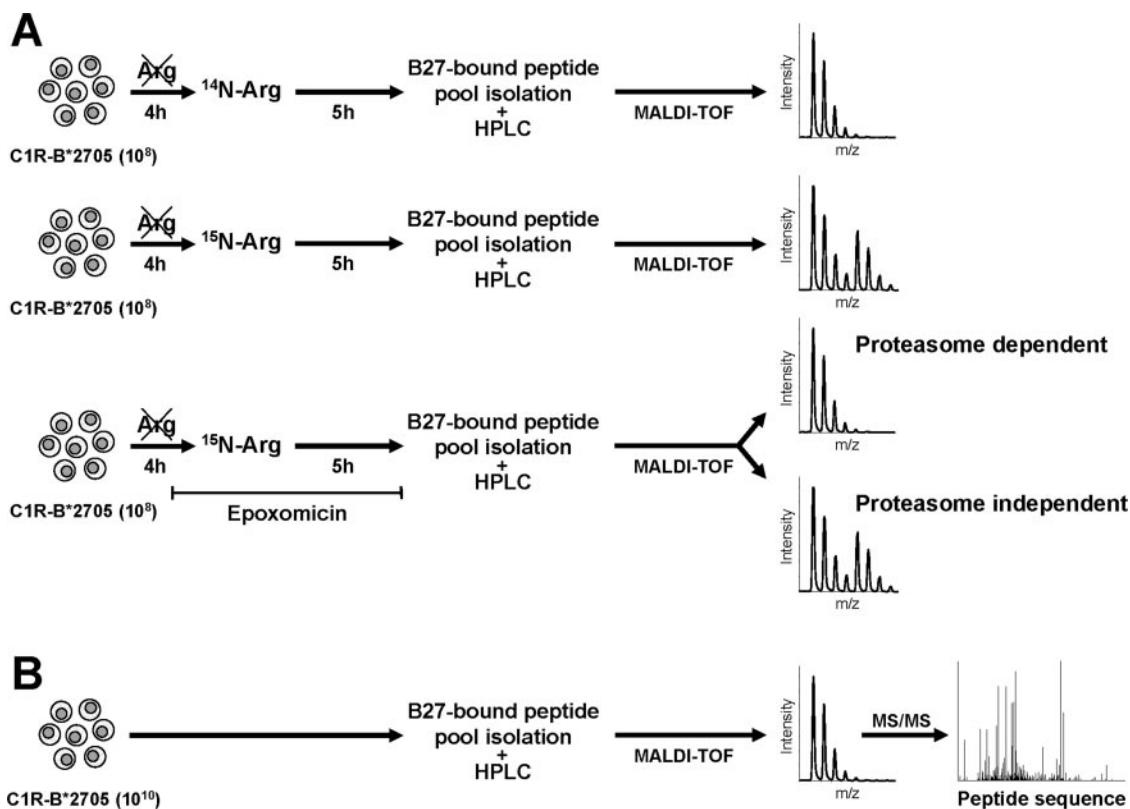
E-poxomicin, an irreversible and specific inhibitor of the proteasome (52), and carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (MG132), a potent reversible inhibitor of the proteasome and calpains (11), were from Calbiochem. Brefeldin A (BFA), which blocks egress of MHC-peptide complexes from the ER (53), was from Sigma-Aldrich.

**Acid Stripping and Flow Cytometry**—About  $10^6$  C1R-B\*2705 transfectant cells were either untreated, preincubated for 2 h with 1  $\mu\text{M}$  epoxomicin, or preincubated for 30 min with BFA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Cells were centrifuged, and pellets were resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of stripping buffer (0.5 M glycine, 1% bovine serum albumin, pH 2.5) and incubated for 2 min. This suspension was neutralized by adding Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen) to a final volume of 15 ml. Cells were centrifuged and resuspended in 2 ml of RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS in the presence or absence of BFA (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or 1  $\mu\text{M}$  epoxomicin. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur instrument (BD Biosciences) as described previously (54).

**Isotopic Labeling of C1R-B\*2705 Cells**—The strategy used is summarized in Fig. 1. C1R-B\*2705 transfectants were distributed in three culture flasks (about  $1.5 \times 10^8$  cells/flask) and incubated for 4 h in Dulbecco's modified Eagle's medium without Arg and supplemented with 10% FCS. One of the flasks was then supplemented with standard ( $^{14}\text{N}$ ) Arg (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), a second flask was supplemented with 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  L-[guanido- $^{15}\text{N}_2$ ]arginine-HCl (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA), in which two nitrogen atoms of the guanidinium group have been replaced with  $^{15}\text{N}$ , and the third flask was treated with 1  $\mu\text{M}$  or, in other experiments, with 0.2 and 2.5  $\mu\text{M}$  epoxomicin for 30 min prior to the addition of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $^{15}\text{N}$ -tagged Arg to ensure that the proteasome was inhibited from the start of labeling, and the inhibitor was left for the entire labeling period. After 5 h, the cells were washed twice in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5. Pellets were stored at  $-70^\circ\text{C}$  for further processing. In some experiments 20  $\mu\text{M}$  MG132 was used instead of epoxomicin in the same conditions except that starving of cells in the absence of Arg before labeling was carried out for 2 h. All incubations were done at  $37^\circ\text{C}$ . Peptide labeling was quantified by the labeling ratio, which was defined as follows. Ratio =  $(^{15}\text{N} + \text{inh.}) - ^{14}\text{N}) / (^{15}\text{N} - ^{14}\text{N})$  where  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $(^{15}\text{N} + \text{inh.})$  are the percent intensities of the relevant isotopic peak, relative to the monoisotopic peak, in the MALDI-TOF MS spectrum of the peptide in the absence of labeling or upon labeling with [ $^{15}\text{N}$ ]Arg in the absence of inhibitor or in its presence, respectively.

**Isolation of HLA-B27-bound Peptides**—B\*2705-bound peptides were isolated from about  $1.5 \times 10^8$  C1R-B\*2705 transfectant cells as described previously (55). Briefly cells were lysed in 1% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich) in the presence of a mixture of protease inhibitors. After ultracentrifugation, the soluble fraction was subjected to affinity chromatography using the W6/32 mAb. HLA-B27-bound peptides were eluted with 0.1% aqueous TFA at room temperature, filtered through Centricon 3 devices (Amicon, Beverly, MA), concentrated, and subjected to HPLC fractionation in a Waters Alliance system (Waters, Milford, MA) using a Vydac 218TP52 column (Vydac, Hesperia, CA) at a flow rate of 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  as described previously (15). Fractions of 50  $\mu\text{l}$  were collected. For peptide sequencing, which required higher amounts of material, the same procedure was used but starting from about  $10^{10}$  C1R-B\*2705 cells. The relevant peptides to be sequenced were identified as those with the same monoisotopic mass and retention time as the labeled peptides by comparing the MALDI-TOF MS spectra of correlative and highly matched HPLC fractions from this peptide pool and those from the labeling experiments obtained from consecutive chromatographic runs under identical conditions (Fig. 1).

**Mass Spectrometry**—HPLC fractions were analyzed by MALDI-TOF MS using a Bruker Reflex IV<sup>TM</sup> or an Autoflex mass spectrometer (both from Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with the



**FIG. 1. Stable isotope tagging-based strategy to distinguish between proteasome-independent and -dependent HLA-B27 ligands.** *A*, three equal aliquots of C1R-B\*2705 cells were subjected to Arg starving for 4 h and subsequently incubated for 5 h either in the presence of standard ( $^{14}\text{N}$ ) Arg,  $^{15}\text{N}_2$ -tagged Arg, or  $^{15}\text{N}_2$ -tagged Arg in the presence of various concentrations of epoxomicin. The proteasome inhibitor was added 30 min before the addition of the isotope, to ensure inhibition of the proteasome upon labeling, and left for the entire labeling period. HLA-B27-bound peptide pools were isolated in parallel from the three cell lysates by immunopurification of HLA-B27 and acid extraction and subjected to HPLC in consecutive runs under identical conditions. Labeling of HLA-B27 ligands was detected by high resolution MALDI-TOF MS as an increased intensity of the corresponding isotopic peak in the absence of epoxomicin (in the example *A* + 4, corresponding to a peptide with 2 Arg residues, where *A* is the monoisotopic peak). In the presence of the inhibitor, labeling of proteasome-dependent peptides is inhibited, and the MS spectrum of the peptide is indistinguishable from that of the unlabeled control. Labeling of a proteasome-independent peptide will be unaffected by the inhibitor so that the MS spectrum will be similar upon labeling either in the presence or absence of epoxomicin. *B*, for peptide sequencing, the HLA-B27-bound peptide pool was isolated from  $10^{10}$  cells and subjected, in parallel to the labeled samples and with the same conditions, to HPLC and MALDI-TOF MS analysis of the individual chromatographic fractions. The relevant peptides were identified from highly matched MALDI-TOF spectra of correlative HPLC fractions on the basis of identity in molecular mass and retention time. Sequencing was done by nanoelectrospray MS/MS.

SCOUT<sup>TM</sup> source operating in positive ion reflector mode. Dried HPLC fractions were resuspended in 0.5  $\mu\text{l}$  of TA (33% aqueous acetonitrile, 0.1% TFA), loaded onto the MALDI plate, and allowed to dry at room temperature. Then 0.5  $\mu\text{l}$  of matrix solution ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in TA) at 2 mg/ml were added and allowed to dry again.

Peptide sequencing was carried out by quadrupole ion trap nano-electrospray MS/MS in an LCQ instrument (Finnigan Thermoquest, San Jose, CA) using the Xcalibur 2.0 software (Thermo Scientific) or in an Esquire 3000<sup>Plus</sup> ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics) using the Bio Tools 2.2 software (Bruker Daltonics) after on-line chromatographic separation of samples as described previously (56). Interpretation of mass spectra was done manually but assisted by various software tools as follows. Manual inspection of the spectrum usually allowed us to determine a partial sequence. This information together with the  $m/z$  of the parent ion (in most cases charge 2 parent ions were used for sequencing in this study) was used as input data for a MASCOT (version 2.1) search (Matrix Science) in the human protein entries of the Mass Spectrometry Protein Sequence Database

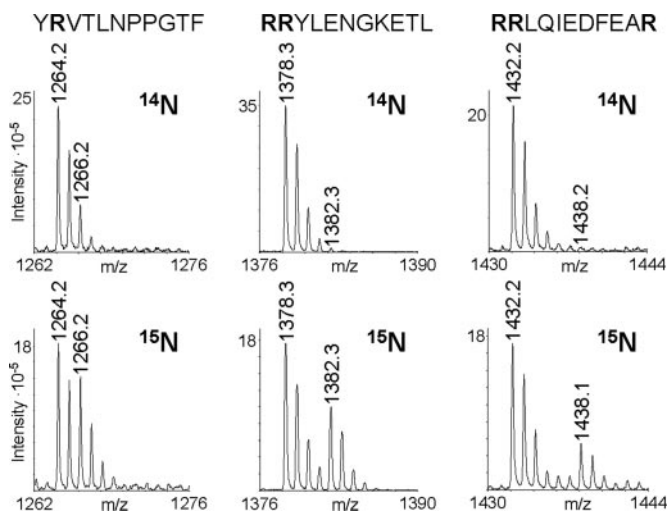
(MSDB) (release August 31, 2006) (Imperial College, London, UK) using a window of 0.8  $m/z$  units. Of the 20 output sequences showing the highest scores in this preliminary search, those few showing the canonical Arg at P2 motif of HLA-B27 ligands (10, 47) and absence of "prohibited" residues for HLA-B27 binding, such as N-terminal or C-terminal Pro, were selected. From each of these sequences, a list of theoretical fragment ions was generated using the MS-Product tool (67) as an assistance to match the putative candidate sequences to our experimental MS/MS spectrum (see the supplemental data). At this stage, usually one single proper match was obtained. If ambiguity existed for more than one sequence or if the sequence determined had not been reported previously as an HLA-B27 ligand, the corresponding synthetic peptides were obtained, and their MS/MS spectra were matched for identity with our experimental spectra.

**Assignment of the Parental Proteins of HLA-B27 Ligands**—This was done on the basis of unambiguous matching with a single human protein in the UniProtKB database release 9.5 (January 23, 2007) using the Fasta 3 software (www.ebi.ac.uk/fasta) after taking into account the database redundancy due to multiple entries for the



same protein. In some cases, a peptide ligand matched several closely related members of a protein family (i.e. histone families). In these cases a single entry for a representative member was chosen with the understanding that the same ligand can arise from more than one member of such families.

**Databases and Statistical Analysis**—The molecular mass and theoretical pI of the assigned proteins was obtained from the UniProt KB database release 9.5 (January 23, 2007; www.expasy.org/sprot). Subcellular localization of the proteins was obtained from the UniProtKB release 9.5 (January 23, 2007) and DAVID2006 (57) databases.



**FIG. 2. Stable isotope tagging of HLA-B27 ligands with [ $^{15}\text{N}$ ]Arg.** Three examples corresponding to peptides with 1, 2, or 3 Arg residues (highlighted in *boldface*) are shown. The figure shows the expanded MALDI-TOF spectra of the corresponding peptides isolated from unlabeled ( $^{14}\text{N}$ ) or [ $^{15}\text{N}$ ]Arg-labeled ( $^{15}\text{N}$ ) cells. The spectra from unlabeled cells show the normal distribution of isotopic species whose relative intensities closely parallel the theoretical intensities. Upon labeling with  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg, containing two  $^{15}\text{N}$  atoms, the MS spectrum is altered by a selective increase of the corresponding isotopic species:  $A + 2$ ,  $A + 4$ , or  $A + 6$  for peptides with 1, 2, or 3 Arg residues, respectively, where  $A$  is the monoisotopic peak.

Proteome analysis was performed with 15,495 entries from the human annotated protein database in the UniProtKB/Swiss-Prot database and assisted by the Jvarkit 2.0 software (75). Statistical analyses were carried out using the  $\chi^2$  or, for smaller samples, the Fisher's exact test.  $p$  values  $< 0.05$  were considered as statistically significant.

## RESULTS

**Proteasome-dependent and -independent Ligands Can Be Distinguished by Isotopic Labeling of the B27-bound Peptide Repertoire**—To determine the role of the proteasome in generating the B\*2705-bound peptide repertoire an approach based on stable isotope tagging of the HLA-B27 ligands was developed (Fig. 1).  $^{15}\text{N}$ -Tagged Arg was used to achieve the labeling of virtually every single peptide. C1R-B\*2705 cells were subjected to Arg starving. Then equal aliquots were either supplemented with standard ( $^{14}\text{N}$ ) Arg, with the same amount of  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg, or treated with epoxomicin prior to the addition of the  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg and incubated in the presence of the inhibitor. The B\*2705-bound peptide pool was isolated from each aliquot and fractionated by HPLC, and each fraction was analyzed by MALDI-TOF MS. The peptides isolated from cells treated with  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg showed a different isotopic distribution compared with that of the same peptides derived from cells supplemented with standard Arg. As the  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg is 2 Da heavier than its non-tagged counterpart, labeling was detected as an increase of the intensity of the  $A + 2$ ,  $A + 4$ , or  $A + 6$  peaks (where  $A$  is the monoisotopic peak) and, proportionally, the subsequent peaks, depending on the number of Arg residues of the peptide (Fig. 2). The extent of this increase was variable among peptides as it depends on multiple factors, such as the synthesis rate of the parental protein, the efficiency in the generation of the peptide, its cytosolic stability, the transport and HLA-B27 binding efficiencies, etc., but it was highly reproducible for individual peptides (Table I).

**TABLE I**  
*Reproducibility of [ $^{15}\text{N}$ ]Arg labeling and inhibition of B\*2705 ligands*

Six examples from two independent experiments are shown. Values under the  $^{14}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ , and  $^{15}\text{N} + \text{Ep}$  columns indicate the percent intensity of the relevant isotopic peak ( $A + 2$ ,  $A + 4$ , or  $A + 6$  for peptides with 1, 2, or 3 Arg residues, respectively) relative to the corresponding monoisotopic ( $A$ ) ion peak. The concentration of epoxomicin in these experiments was  $1 \mu\text{M}$ .

Ion peak ( $M + H^+$ )	Sequence	Exp.	$^{14}\text{N}$	$^{15}\text{N}$	$^{15}\text{N} + \text{Ep}$	Ratio <sup>a</sup>
Proteasome-dependent ligands						
1051.3	NRFAGFGIGL	1	24.0	51.2	22.7	0
		2	25.6	57.4	25.4	0
1137.2	IRLPQYNF	1	25.1	37.4	23.6	-0.1
		2	24.7	41.2	24.6	0
1378.3	RRYLENGKETL	1	2.9	55.5	3.3	0
		2	2.5	61.1	2.4	0
Proteasome-independent ligands						
1153.5	RRFGDKLNF	1	2.9	30.0	33.2	1.1
		2	1.4	33.0	28.7	0.9
1099.5	RRLALFPGVA	1	3.4	27.6	17.2	0.6
		2	1.2	29.5	22.6	0.8
1284.2	RRISGVDRYY	1	2.2	20.3	14.6	0.7
		2	2.0	16.2	12.9	0.8

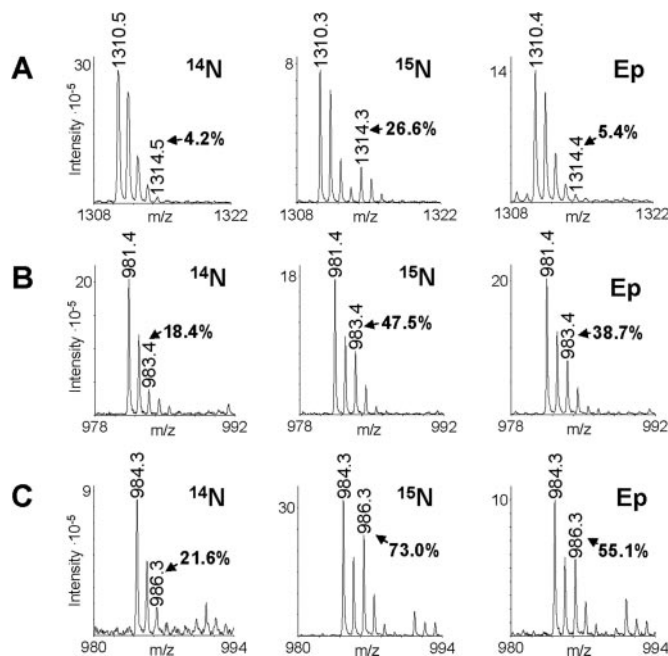
<sup>a</sup> The labeling ratio was calculated as follows:  $((^{15}\text{N} + \text{Ep}) - ^{14}\text{N}) / (^{15}\text{N} - ^{14}\text{N})$ .



We reasoned that the isotopic labeling of a proteasome-independent ligand isolated from cells treated with  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg would be significant regardless of the presence or absence of epoxomicin in the culture medium because its generation would not be abrogated by inhibition of the proteasome. In contrast, no labeling should be detected in proteasome-dependent ligands when isolated from cells treated with epoxomicin plus  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg because these ligands would not be generated in the presence of the inhibitor. Thus, the isotopic distribution of proteasome-dependent ligands isolated from [ $^{15}\text{N}$ ]Arg-labeled cells in the presence of epoxomicin or from unlabeled cells should be essentially the same (Fig. 1).

To test this assumption we compared the isotopic distributions of RRFFPYVY, a B27 ligand known to be generated in a proteasome-dependent fashion (15), isolated from control,  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg-, and  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg plus  $1\ \mu\text{M}$  epoxomicin-treated cells (Fig. 3A). As expected,  $^{15}\text{N}$  labeling was detected in the ligand from untreated but not from epoxomicin-treated cells. On the other hand, the peptides IRAPPPLF and ARLQTALLV are derived from the signal sequences of cathepsin A and cytokine A22, respectively, and are presented by HLA-B27 in the TAP-deficient T2 cells,<sup>2</sup> suggesting that they are processed in the ER. In both cases we detected a significant, but about 19–24% lower,  $^{15}\text{N}$  labeling of the ligands when isolated from epoxomicin-treated cells relative to cells supplemented with  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg in the absence of the inhibitor (Fig. 3, B and C). Because these two ligands are probably proteasome-independent their lower labeling in the presence of epoxomicin cannot be explained by partial inhibition of the proteasome (see “Discussion”).

**A Significant Portion of the HLA-B27-bound Peptide Repertoire Is Generated in the Presence of Epoxomicin**—In an initial experiment proteasome inhibition was carried out with  $1\ \mu\text{M}$  epoxomicin. Upon MALDI-TOF analysis of the B\*2705-bound peptide pool 91 ion peaks were amenable to further analysis on the following basis. 1) They showed sufficiently high intensity for good detection of multiple isotopic peaks, and 2) the relevant isotopic peak increased at least 20% upon  $^{15}\text{N}$  labeling in the absence of inhibitor relative to its intensity in unlabeled cells (Fig. 4). A given ligand was considered to be proteasome-independent if the intensity of the corresponding isotopic peak upon labeling in the presence of epoxomicin increased by at least 40% of the increase of that peak in the absence of the inhibitor (labeling ratio,  $\geq 0.4$ ). In contrast, the proteasome-dependent ligands were those that were labeled in the absence but not in the presence of epoxomicin (labeling ratio,  $\leq 0.2$ ). The threshold of 0.4 for the labeling ratio was adopted because proteasome-independent peptides may be less labeled in the presence of epoxomicin than in its absence due to indirect effects following proteasome inhibition, such as down-regulation of protein synthesis (see below and “Dis-



**FIG. 3. Metabolic labeling allows proteasome-dependent HLA-B27 ligands to be distinguished from proteasome-independent HLA-B27 ligands.** A, MALDI-TOF MS spectra of the proteasome-dependent peptide RRFFPYVY (15) isolated from unlabeled cells ( $^{14}\text{N}$ ), [ $^{15}\text{N}$ ]Arg-labeled cells in the absence of epoxomicin ( $^{15}\text{N}$ ), and labeled cells in the presence of a  $1\ \mu\text{M}$  concentration of the inhibitor epoxomicin (Ep). The expanded MS spectrum of the peptide from unlabeled cells shows the normal distribution of isotopic species. Upon labeling with  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg, containing two  $^{15}\text{N}$  atoms, the MS spectrum is altered by a selective increase of the corresponding isotopic species,  $A + 4$  in this example where A is the monoisotopic peak. In the presence of epoxomicin this alteration is not observed. The percent intensity of the  $A + 4$  peaks relative to the corresponding monoisotopic peaks in each situation is indicated. B, MALDI-TOF MS spectra of the TAP-independent IRAPPPLF ligand, matching the signal sequence of cathepsin A, isolated in the same three situations. C, MALDI-TOF MS spectra of the TAP-independent ARLQTALLV ligand, matching the signal sequence of cytokine A22, in the same conditions.

cussion”). The labeling of 62 of the 91 peptides (68.1%) was abolished with  $1\ \mu\text{M}$  epoxomicin (Fig. 4A), suggesting a key role of the proteasome for their generation. In 29 ligands (31.9%) labeling was significant in the presence of epoxomicin, suggesting that they were proteasome-independent. Very similar results were obtained when using MG132 instead of epoxomicin as proteasome inhibitor. Although fewer peptides were analyzed, the pattern of inhibition with MG132 for each of the peptides analyzed was the same as with epoxomicin (Fig. 4C).

**Generation of HLA-B27 Ligands in the Presence of Variable Concentrations of Epoxomicin**—In a recent study (58), incubation of HeLa cells with  $0.15\ \mu\text{M}$  epoxomicin abrogated the chymotrypsin-like activity of the proteasome by about 85%, but its trypsin-like activity was only inhibited by about 28%. In contrast,  $2\ \mu\text{M}$  epoxomicin was required to achieve extensive inhibition of both activities (about 98 and 87%, respectively).

<sup>2</sup> M. Ramos and J. A. López de Castro, unpublished data.

A Epoxomicin-sensitive (N=62)							
Fraction N	M+H <sup>+</sup>	<sup>14</sup> N	<sup>15</sup> N	<sup>15</sup> N + Ep.	R	Ratio	Sequence
134	1012.2	24.2	34.4	23.4	1	-0.1	
205	1014.3	25.2	38.5	23.0	1	-0.2	
171 (*)	1015.7	22.3	28.0	21.2	1	-0.2	
138	1027.2	20.2	48.9	20.2	1	0.0	(*)
138 (*)	1039.4	17.5	39.0	18.1	1	0.0	GRIDKPILK
117	1051.3	20.4	48.3	21.7	1	0.0	
201 (*)	1051.3	24.0	51.2	22.7	1	0.0	NRFAGFGIGL (*)
203	1064.3	25.6	49.4	26.0	1	0.0	
186	1070.3	21.5	46.0	21.7	1	0.0	
183	1081.3	24.8	32.6	22.5	1	-0.3	
155	1086.3	22.8	42.9	22.5	1	0.0	SRTFYHVNIL
131 (*)	1087.2	25.1	47.3	24.3	1	0.0	GRLTKHTKF
162	1120.3	32.2	41.9	28.2	1	-0.4	ARLKEVLEY
184	1124.2	22.7	32.0	21.1	1	-0.2	LRNQSVFNF
127	1135.3	49.1	87.3	47.0	1	-0.1	
178 (*)	1137.2	25.1	37.4	23.6	1	-0.1	IRLPSQYNE
144	1147.3	31.5	38.1	31.3	1	0.0	SRAGPLSGKKE
120	1152.2	31.4	43.0	32.6	1	0.1	
175	1182.3	32.0	62.5	32.9	1	0.0	
138 (*)	1184.1	30.5	43.1	26.0	1	-0.4	KRYKSIVKY
150	1185.5	44.8	53.8	39.9	1	-0.5	KRFDDKYTL
191	1190.1	22.9	47.7	23.6	1	0.0	
169 (*)	1190.3	28.4	58.6	30.1	1	0.1	GRKAIQLEY
150	1217.3	33.5	58.2	36.8	1	0.1	ARYGKSPYLY (*)
165	1244.2	40.3	74.6	43.5	1	0.1	KRFSPVQHF
124	1258.3	32.4	39.5	33.6	1	0.2	HRFYGNSSY
164	1301.4	36.1	71.9	34.9	1	0.0	ARNPSLKQQLF (*)
165	1361.1	32.6	55.5	36.1	1	0.2	HRFEQAFYTY (*)
148 (*)	1589.3	42.7	118.3	39.7	1	0.0	
128 (*)	941.2	2.7	30.5	4.5	2	0.1	
164	962.4	2.0	12.7	1.9	2	0.0	GRFSGLLGR
145	988.4	2.7	12.6	2.2	2	-0.1	GRIPGIYGR
130 (*)	999.3	2.2	29.5	3.6	2	0.1	
154 (*)	1031.5	1.0	20.9	2.5	2	0.1	ARLFGIRAK
133 (*)	1043.3	4.5	13.9	4.0	2	-0.1	
132	1056.3	9.1	73.7	8.3	2	0.0	
169	1059.3	4.5	16.0	4.3	2	0.0	
184	1088.3	1.9	9.8	2.1	2	0.0	SRFPEALRL
161	1105.2	6.8	16.1	6.2	2	-0.1	SRLAIRNEF
156 (*)	1134.3	2.9	10.1	3.6	2	0.1	
132 (*)	1134.3	5.5	17.4	5.9	2	0.0	KRFEGLTQR
125 (*)	1143.3	3.2	15.2	4.0	2	0.1	
116	1143.6	3.0	16.8	2.9	2	0.0	
186	1146.2	3.6	14.0	4.6	2	0.1	RFFFPYVY
164	1152.3	7.2	59.0	16.1	2	0.2	
148 (*)	1170.3	3.4	24.3	4.9	2	0.1	RRDFNHINV
155 (*)	1175.3	5.7	20.6	9.9	2	0.3	FRYNGLIHR
122 (*)	1180.3	4.9	21.5	4.8	2	0.0	RRYQKSTEL
162	1181.3	8.3	34.1	8.9	2	0.0	
133	1203.4	11.3	25.4	12.0	2	0.1	
181	1260.3	4.8	7.0	4.6	2	-0.1	
150 (*)	1293.4	6.8	33.6	8.8	2	0.1	
200	1300.3	11.7	32.7	7.0	2	-0.2	RRKDGVLFLY (*)
150	1303.3	13.9	30.6	12.7	2	-0.1	
190 (*)	1310.5	4.3	26.6	5.4	2	0.0	RFFFPYVY (*)
141 (*)	1378.2	2.9	55.5	3.3	2	0.0	RRYLENGKETL (*)
193	1027.2	6.8	45.1	6.5	3	0.0	
119	1124.3	4.5	44.3	11.3	3	0.2	
151 (*)	1132.4	8.9	41.4	7.2	3	-0.1	
169	1323.2	3.0	16.2	4.7	3	0.1	
153 (*)	1562.6	1.8	22.5	3.2	3	0.1	
130 (*)	1662.2	1.0	61.4	2.7	3	0.0	RRYLENGKETLQR

B Epoxomicin-insensitive (N=29)							
Fraction N	M+H <sup>+</sup>	<sup>14</sup> N	<sup>15</sup> N	<sup>15</sup> N + Ep.	R	Ratio	Sequence
185 (*)	981.4	18.4	47.5	38.7	1	0.7	IRAAPPPLF
184 (*)	984.3	21.6	73.0	55.1	1	0.7	ARLQTALLV (**)
196	1012.3	18.4	42.2	34.9	1	0.7	
185	1036.4	21.3	36.0	27.0	1	0.4	
191	1086.3	21.5	42.5	51.5	1	1.4	LRVTPFILK (**)
137 (*)	1126.1	27.1	55.7	42.4	1	0.5	QRKKAYADF (**)
178 (*)	1151.2	29.0	40.0	40.6	1	1.1	QRNVNVFKF
175	1176.2	28.8	56.1	39.7	1	0.4	
189 (*)	1208.5	21.9	68.0	108.4	1	1.9	VRLLPGEELAK
147 (*)	1217.3	26.3	65.9	68.3	1	1.1	GRFNGQFKTY (**)
178	1264.2	31.9	75.7	84.3	1	1.2	YRVTLNPPGTF
120 (*)	1299.3	40.1	77.2	71.9	1	0.9	
134 (*)	970.4	6.9	25.2	17.3	2	0.6	
138	1002.1	13.1	37.7	82.3	2	2.8	
190 (*)	1099.5	3.4	27.6	17.2	2	0.6	RRLALFPGVA
156 (*)	1103.4	3.3	13.7	14.4	2	1.1	KRLVVEFAR
166 (*)	1153.5	2.9	30.0	33.2	2	1.1	RRFGDKLNF
187	1180.3	4.8	38.0	19.4	2	0.4	
161 (*)	1187.2	6.6	68.0	35.4	2	0.5	SRAGLQFPVGR
187 (*)	1234.1	2.9	22.3	11.7	2	0.5	RRFVNVVPTF (**)
173	1266.2	5.0	29.0	14.8	2	0.4	
169 (*)	1276.2	11.7	46.6	35.0	2	0.7	RRLQIEDFEA
181 (*)	1291.4	5.4	28.7	17.6	2	0.5	RRFVNVVPTFG
124 (*)	1341.3	10.8	44.7	23.7	2	0.4	ARFSPDDKYSR
172 (*)	1419.5	4.4	27.6	16.8	2	0.5	RRFVNVVPTFGK (**)
140 (*)	1284.2	2.2	20.3	14.6	3	0.7	RRISGVDRYY (**)
198	1288.5	6.2	34.0	21.0	3	0.5	
148	1386.4	3.2	29.4	23.2	3	0.8	
161 (*)	1432.1	3.0	31.6	18.9	3	0.6	RRLQIEDFEAR (**)

C MG132-sensitive (N=8)							
Fraction N	M+H <sup>+</sup>	<sup>14</sup> N	<sup>15</sup> N	<sup>15</sup> N + MG132	R	Ratio	Sequence
190	1027.2	22.3	28.0	23.5	1	0.2	(*)
198	1051.3	20.7	37.6	20.7	1	0.0	NRFAGFGIGL (*)
149	1217.3	39.2	50.7	40.5	1	0.1	ARYGKSPYLY (*)
162	1301.4	34.0	71.4	37.3	1	0.1	ARNPSLKQQLF (*)
162	1361.5	36.4	46.6	35.2	1	-0.1	HRFEQAFYTY (*)
197	1300.3	5.0	12.2	5.7	2	0.1	RRKDGVLFLY (*)
187	1310.5	4.0	20.8	4.2	2	0.0	RFFFPYVY (*)
139	1378.2	6.2	29.5	3.6	2	-0.1	RRYLENGKETL (*)

MG132-insensitive (N=9)							
Fraction N	M+H <sup>+</sup>	<sup>14</sup> N	<sup>15</sup> N	<sup>15</sup> N + MG132	R	Ratio	Sequence
181	984.3	22.0	41.2	30.4	1	0.4	ARLQTALLV (**)
188	1086.3	25.6	42.0	37.1	1	0.7	LRVTPFILK (**)
136	1126.1	24.1	50.4	40.6	1	0.6	QRKKAYADF (**)
145	1217.3	28.2	41.5	40.5	1	0.9	GRFNGQFKTY (**)
184	1234.1	4.1	16.7	9.1	2	0.4	RRFVNVVPTF (**)
169	1419.5	4.4	21.1	11.6	2	0.4	RRFVNVVPTFGK (**)
138	1284.2	1.1	17.0	10.7	3	0.6	RRISGVDRYY (**)
195	1288.5	3.0	24.0	10.6	3	0.4	(**)
158	1432.1	4.8	26.7	13.6	3	0.4	RRLQIEDFEAR (**)

FIG. 4. Isotopic labeling of HLA-B27 ligands in the presence of proteasome inhibitors. A total of 91 and 17 ion peaks showing sufficient intensity in their MALDI-TOF MS spectra were analyzed with 1  $\mu$ M epoxomicin (A and B) and 20  $\mu$ M MG132 (C), respectively. Their elution position in HPLC (Fraction N), monoisotopic mass (A; M + H<sup>+</sup>), the percent relative intensity of the corresponding A + 2, A + 4, or A + 6 peak in the absence of labeling (<sup>14</sup>N), upon [<sup>15</sup>N]Arg labeling (<sup>15</sup>N), or upon labeling in the presence of epoxomicin (<sup>15</sup>N + Ep) or MG132 (<sup>15</sup>N + MG132), the number of Arg residues (R), and the labeling ratio (Ratio; see "Experimental Procedures") are indicated. Peptides were classified as proteasome-dependent (inhibitor-sensitive) or -independent (inhibitor-insensitive) when the labeling ratio was  $\leq 0.2$  or  $\geq 0.4$ , respectively. The peptide FRYNGLIHR (A; Fraction N, 155; M + H: 1175.3) was assigned as proteasome-dependent due to its total inhibition with 2.5  $\mu$ M epoxomicin (Fig. 5). Within each set, the peptides are ordered by their number of Arg residues, which was inferred from the isotopic peak that increased upon [<sup>15</sup>N]Arg labeling and by molecular mass. Ion peaks that were sequenced are indicated. Ion peaks analyzed with additional concentrations of epoxomicin (Fig. 5) are indicated with (\*) by their HPLC Fraction N. Ion peaks assigned with both epoxomicin and MG132 are labeled with one (\*) or two (\*\*) asterisks in the Sequence column if they were inhibitor-sensitive or -insensitive, respectively. Ion peaks without asterisks in this column were assigned only with epoxomicin.



A PROTEASOME-DEPENDENT (N=35)									
Fraction N	M+H <sup>+</sup>	<sup>14</sup> N	<sup>15</sup> N	R	<sup>15</sup> N 0.2 $\mu$ M Ep.	<sup>15</sup> N 2.5 $\mu$ M Ep.	Ratio L	Ratio H	Sequence
170 (*)	1015.5	16.8	24.7	1	18.6	15.6	0.2	-0.2	
151	1033.3	26.6	60.2	1	25.6	29.4	0.0	0.1	
132	1034.3	20.8	38.8	1	19.3	17.5	-0.1	-0.2	
138 (*)	1039.4	16.7	29.0	1	15.2	14.8	-0.1	-0.2	GRIDKPILK
200 (*)	1051.3	17.0	39.7	1	16.3	18.3	0.0	0.1	NRFAGFGIGL
180	1076.3	14.1	42.1	1	15.7	ND	0.1	ND	
133 (*)	1087.6	17.6	29.6	1	20.8	18.8	0.3	0.1	GRITKHTKF
138	1126.3	26.6	41.4	1	32.7	28.4	0.4	0.1	
178 (*)	1137.2	17.1	30.6	1	27.1	15.4	0.7	-0.1	IRLPSQYNF
138 (*)	1184.4	19.6	40.9	1	17.6	22.5	-0.1	0.1	KRYKSIVKY
169 (*)	1190.7	22.7	35.9	1	15.6	ND	-0.5	ND	GRIKAIQLEY
164	1299.3	20.7	54.7	1	29.2	23.2	0.3	0.1	
148 (*)	1589.4	43.8	73.4	1	45.6	39.8	0.1	-0.1	
128 (*)	941.2	1.1	15.2	2	2.3	2.3	0.1	0.1	
130 (*)	999.4	3.3	11	2	0.8	2.2	-0.3	-0.1	
153	1015.4	8.5	18.3	2	ND	7.1	ND	-0.1	
155 (*)	1031.5	1.8	7.0	2	2.3	1.1	0.1	-0.1	ARLFGIRAK
133 (*)	1043.5	0.9	7.1	2	3.2	2.2	0.4	0.2	
136	1062.6	4.3	37.7	2	7.1	6.7	0.1	0.1	
159	1133.1	4.4	18.2	2	2.9	4.3	-0.1	0.0	
156 (*)	1134.0	5.6	12.4	2	6.9	3.8	0.2	-0.3	
132 (*)	1134.4	4.1	12.6	2	2.4	5.6	-0.2	0.2	KRFEGTLQR
125 (*)	1143.5	1.4	6.6	2	2.1	1.8	0.1	0.1	
150	1169.2	12.1	31.9	2	15.3	11.5	0.2	0.0	
148 (*)	1170.3	6.9	13.8	2	7.1	7.9	0.0	0.1	RRDFNHINV
155 (*)	1175.4	6.6	10.4	2	10.5	4.6	1.0	-0.5	FRYNGLIHR
123 (*)	1180.4	3.5	13.9	2	3.3	1.9	0.0	-0.2	RRYQKSTEL
130	1194.4	11.4	53.8	2	ND	20.2	ND	0.2	
159	1225.0	6.4	31.6	2	4.3	3.9	-0.1	-0.1	KRQRTLYGF
149 (*)	1293.2	5.8	25.5	2	7.3	5.9	0.1	0.0	
189 (*)	1310.6	3.2	16.1	2	2.8	5.5	0.0	0.2	RRFFPYVYV
140 (*)	1378.6	2.0	28.1	2	2.4	1.1	0.0	0.0	RRYLENGKETL
151 (*)	1132.4	11.8	28.2	3	5.0	13.2	-0.4	0.1	
153 (*)	1562.5	0.8	13.6	3	2.8	1.9	0.2	0.1	
130 (*)	1662.4	0.6	30.1	3	ND	0.3	ND	0.0	RRYLENGKETLQR

B PROTEASOME-INDEPENDENT (N=21)									
Fraction N	M+H <sup>+</sup>	<sup>14</sup> N	<sup>15</sup> N	R	<sup>15</sup> N 0.2 $\mu$ M Ep.	<sup>15</sup> N 2.5 $\mu$ M Ep.	Ratio L	Ratio H	Sequence
185 (*)	981.6	13.6	41.4	1	28.0	29.1	0.5	0.6	IRAPPPPLF (**)
183 (*)	984.6	28.1	74.6	1	50.9	42.1	0.5	0.3	ARLQTALLV (**)
137 (*)	1126.6	24.0	44.3	1	39.0	37.5	0.7	0.7	QRKKAYADF
177 (*)	1151.2	25.5	38.8	1	54.7	38.8	2.2	1.0	QRNVNVEKF
188 (*)	1208.5	22.9	72.5	1	99.6	122.0	1.5	2.0	VRLLLPGEIAK
147 (*)	1217.1	28.5	53.2	1	47.1	45.5	0.8	0.7	GRFNGQFKTY
121 (*)	1299.3	29.5	66.1	1	52.0	51.5	0.6	0.6	
134 (*)	970.1	1.1	13.2	2	11.5	5.9	0.9	0.4	
189 (*)	1099.6	3.0	18.7	2	9.3	11.1	0.4	0.5	RRLALFPGVA
156 (*)	1103.0	2.4	10.3	2	8.8	6.8	0.8	0.6	KRLVVFDAK
165 (*)	1153.7	2.4	15.6	2	16.2	9.9	1.0	0.6	RRFGDKLNF
175	1173.5	12.2	35.8	2	64.8	77.6	2.2	2.8	
160 (*)	1187.2	4.5	62.3	2	45.7	42.1	0.7	0.7	SRAGLQFPVGR
186 (*)	1234.7	4.7	10.0	2	8.4	9.9	0.7	1.0	RRFVNVPVTF
169 (*)	1276.2	4.6	23.1	2	28.8	26.4	1.3	1.2	RRLQIEDFEA
181 (*)	1291.3	1.0	14.3	2	11.7	5.4	0.8	0.3	RRFVNVPVTFG
124 (*)	1340.8	4.8	22.3	2	13.2	10.4	0.5	0.3	ARFSPDDKYSR
157	1409.3	35.9	60.9	2	85.7	57.4	2.0	0.9	
172 (*)	1419.7	2.7	18.9	2	13.6	9.9	0.7	0.4	RRFVNVPVTFGK
139 (*)	1284.5	2.0	16.2	3	15.5	13.9	1.0	0.8	RRISGVDRYY
160 (*)	1432.1	0.9	24.2	3	13.9	12.3	0.6	0.5	RRLQIEDFEAR

FIG. 5. Isotopic labeling of HLA-B27 ligands in the presence of various concentrations of epoxomicin. A total of 56 ion peaks were analyzed with 0.2 and 2.5  $\mu$ M epoxomicin. Labeling ratios with the low (L) and high (H) concentrations of inhibitor are indicated. Proteasome-dependent (A) and proteasome-independent (B) ligands were assigned based on the inhibition of labeling at the highest concentration of the inhibitor. Conventions are as in Fig. 4 except that the threshold for assigning proteasome-independent ligands was a labeling ratio of 0.3. This threshold value, which is somewhat lower than the one used with a 1  $\mu$ M concentration of the inhibitor, was adopted because it was observed with a TAP-independent ligand (ARLQTALLV; M + H: 984.6) that is presumably generated in the ER and therefore does not reflect partial inhibition of the proteasome. Ion peaks also analyzed at 1  $\mu$ M epoxomicin (Fig. 4) are indicated with (\*) by their HPLC Fraction N. TAP-independent ligands are labeled with (\*\*) in the Sequence column.

The caspase-like activity of the proteasome was virtually not affected by this inhibitor.

Thus, in a second set of experiments, stable isotope tagging of HLA-B27 ligands was carried out in the presence of 0.2 and 2.5  $\mu$ M epoxomicin, respectively. This was done to analyze the effect of the progressive inhibition of the trypsin-like activity of the proteasome on the generation of HLA-B27 ligands and to assess whether the proteasome dependence assignments made on the basis of inhibition with 1  $\mu$ M

E-poxomicin were reliable or might be altered in the presence of higher concentration of this inhibitor.

A total of 56 ion peaks fulfilling the same criteria concerning high intensity and labeling as in the previous paragraph were amenable to further analysis (Fig. 5). Peptides were assigned as proteasome-dependent when their labeling was totally inhibited with 2.5  $\mu$ M epoxomicin as explained in the previous paragraph (see also Fig. 5 legend). A total of 35 (62.5%) and 21 (37.5%) ion peaks were assigned as proteasome-depend-

Proteasome-dependent (N=24)						
Fraction N	M+H <sup>+</sup>	R	Ratio 0.2 $\mu$ M	Ratio 1 $\mu$ M	Ratio 2.5 $\mu$ M	Sequence
171	1015.7	1	0.2	-0.2	-0.2	
138	1039.4	1	-0.1	0.0	-0.2	GRIDKPIIK
201	1051.3	1	0.0	0.0	0.1	NRFAGFGIGL
131	1087.2	1	0.3	0.0	0.1	GRITKHTKF
178	1137.2	1	0.7	-0.1	-0.1	IRLPSQYNF
138	1184.1	1	-0.1	-0.4	0.1	KRYKSIVKY
169	1190.3	1	-0.5	0.1	ND	GRIKAIQLEY
148	1589.3	1	0.1	0.0	-0.1	
128	941.2	2	0.1	0.1	0.1	
130	999.3	2	-0.3	0.1	-0.1	
154	1031.5	2	0.1	0.1	-0.1	ARLFGIRAK
133	1043.3	2	0.4	-0.1	0.2	
156	1134.3	2	0.2	0.1	-0.3	
132	1134.3	2	-0.2	0.0	0.2	KRFEGLTQR
125	1143.3	2	0.1	0.1	0.1	
148	1170.3	2	0.0	0.1	0.1	RRDFNHINV
155	1175.3	2	1.0	0.3	-0.5	FRYNGLIHR
122	1180.3	2	0.0	0.0	-0.2	RRYQKSTEL
150	1293.4	2	0.1	0.1	0.0	
190	1310.5	2	0.0	0.0	0.2	RRFFPYVYV
141	1378.2	2	0.0	0.0	0.0	RRYLENGKETL
151	1132.4	3	-0.4	-0.1	0.1	
153	1562.6	3	0.2	0.1	0.1	
130	1662.2	3	ND	0.0	0.0	RRYLENGKETLQR

Proteasome-independent (N=19)						
Fraction N	M+H <sup>+</sup>	R	Ratio 0.2 $\mu$ M	Ratio 1 $\mu$ M	Ratio 2.5 $\mu$ M	Sequence
185	981.4	1	0.5	0.7	0.6	IRAAPPLF (**)
184	984.3	1	0.5	0.7	0.3	ARLQTALLV (**)
137	1126.1	1	0.7	0.5	0.7	QRKKAYADF
178	1151.2	1	2.2	1.1	1.0	QRNVNVKFK
189	1208.5	1	1.5	1.9	2.0	VRLLPGELAK
147	1217.3	1	0.8	1.1	0.7	GRFNGQFKTY
120	1299.3	1	0.6	0.9	0.6	
134	970.4	2	0.9	0.6	0.4	
190	1099.5	2	0.4	0.6	0.5	RRLALFPGVA
156	1103.4	2	0.8	1.1	0.6	KRLVVFDA
166	1153.5	2	1.0	1.1	0.6	RRFGDKNF
161	1187.2	2	0.7	0.5	0.7	SRAGLQFPVGR
187	1234.1	2	0.7	0.5	1.0	RRFVNVVTF
169	1276.2	2	1.3	0.7	1.2	RRLQIEDFEA
181	1291.4	2	0.8	0.5	0.3	RRFVNVVTFG
124	1341.3	2	0.5	0.4	0.3	ARFSEDDKYSR
172	1419.5	2	0.7	0.5	0.4	RRFVNVVTFGK
140	1284.2	3	1.0	0.7	0.8	RRISGVDRYY
161	1432.1	3	0.6	0.6	0.5	RRLQIEDFEAR

Fig. 6. Comparison of the labeling ratios of 43 HLA-B27 ligands at various concentrations of epoxomicin. Conventions are as in Figs. 3 and 4. This figure summarizes data from both figures to facilitate comparisons. TAP-independent ligands are marked with (\*\*).

ent (Fig. 5A) and -independent (Fig. 5B) ligands, respectively. These percentages are similar to those obtained with a 1  $\mu$ M concentration of the inhibitor.

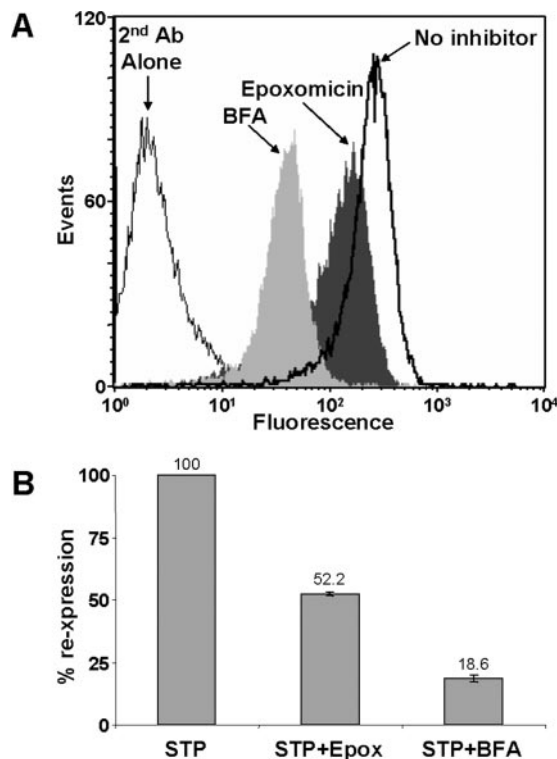
The ion peak series analyzed with either 1  $\mu$ M (Fig. 4) or 0.2/2.5  $\mu$ M (Fig. 5) epoxomicin included a total of 24 proteasome-dependent and 19 proteasome-independent peptides analyzed in both set of experiments (Fig. 6). As many as 20 (83.3%) of the 24 proteasome-dependent peptides in this series showed a labeling ratio  $\leq 0.2$  already with 0.2  $\mu$ M epoxomicin, indicating that most of the proteasome-dependent ligands are not generated under conditions in which the chymotrypsin-like, but not the trypsin-like activity, is inhibited. Only one proteasome-dependent peptide (FRYNGLIHR; M + H: 1175.3) showed some labeling with 1  $\mu$ M epoxomicin but not with a 2.5  $\mu$ M concentration of the inhibitor. The dose-dependent inhibition of this peptide by epoxomicin suggests that it can be generated if the trypsin-like activity of the proteasome is not fully inhibited.

Among the 19 proteasome-independent peptides in this series, 13 (68.4%) showed similar label incorporation at all epoxomicin concentrations so that the decreased labeling of some of them in the presence of the inhibitor was dose-independent (Fig. 6). Moreover two TAP-independent ligands, which are very likely generated in the ER in a proteasome-independent way, also showed decreased labeling in the presence of the inhibitor (Fig. 6). These results strongly suggest that partially decreased labeling in the presence of epoxomicin is due to indirect effects, such as down-regulation of protein synthesis, rather than to partial inhibition of the proteasome.

Four peptides (M + H: 970.4, 1291.4, 1341.3, and 1419.5), two of which were derived from the same protein, showed decreasing labeling as a function of epoxomicin concentration (Fig. 6). However, they were assigned as proteasome-independent because significant labeling was still obtained with the highest concentration of the inhibitor where the proteasomal contribution to the generation of these ligands is very unlikely. This result might be explained by a dose-dependent effect of the inhibitor on the synthesis of the parental proteins. One of the proteasome-independent peptides (VR-LLPGELAK; M + H: 1208.5) showed a dose-dependent increase of labeling with epoxomicin. This result suggests that either the parental protein of this ligand is up-regulated upon proteasome inhibition or that the ligand is actually destroyed by the proteasome.

When the two peptide sets analyzed with either 1 or 0.2/2.5  $\mu$ M epoxomicin were jointly considered (Figs. 4 and 5), the proteasome dependence of 104 different HLA-B27 ligands could be established. Of these, 73 (70.2%) and 31 (29.8%) were assigned as proteasome-dependent and -independent, respectively.

**Surface Expression of HLA-B\*2705 in the Presence of Epoxomicin Parallels the Percentage of Proteasome-independent Ligands**—It was shown previously that the surface re-expression of HLA-B\*2705 after acid stripping in the presence of the conventional proteasome inhibitors lactacystin and N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal was very substantial and higher than for other MHC class I molecules (23). We repeated these experiments, using similar experimental conditions, with the more specific inhibitor epoxomicin, which, to our knowledge, does not inhibit any known protease other than the proteasome, and using the ME1 mAb, which does not react with untransfected C1R cells. The results (Fig. 7) indicated that B\*2705 re-expression in the presence of 1  $\mu$ M epoxomicin was  $\approx 34\%$  of the re-expression in the absence of the inhibitor after subtracting the expression levels in the presence of BFA. This result is similar to that reported by Luckey *et al.* (23) and to the percentage of proteasome-independent ligands described in the previous paragraph, suggesting that the percentage of these ligands determined by stable isotope tagging is representative of the whole B\*2705-bound peptide pool.



**FIG. 7. Surface re-expression of HLA-B\*2705 after acid stripping (STP) in the presence of epoxomicin.** A, C1R-B\*2705 cells were either untreated or preincubated for 2 h with 1  $\mu$ M epoxomicin or for 30 min with 10  $\mu$ g/ml BFA. Then they were acid-washed, allowed to re-express HLA-B27 for 4 h in the presence or absence of these inhibitors, and subjected to flow cytometry with ME1. This mAb does not stain untransfected C1R cells (not shown). A representative experiment, of a total of three independent experiments, is shown. B, mean  $\pm$  S.D. of three experiments showing the percentage of HLA-B27 re-expression in the presence of epoxomicin or BFA relative to its re-expression in the absence of inhibitors. Ab, antibody; Epox, epoxomicin.

**Proteasome-independent and -dependent Ligands Differ Little in Their Peptide Motifs, Flanking Sequences, and Subcellular Localization of Their Parental Proteins**—A total of 19 proteasome-independent and 31 proteasome-dependent ligands were sequenced by MS/MS (Fig. 8). In the former group, only three peptides were derived from signal sequences, whereas the others corresponded to internal protein sequences. A comparison of the structural features of proteasome-dependent and -independent peptides failed to reveal any statistically significant differences in residue usage at the N- and C-terminal positions (P1, PC) or in the adjacent residues within the peptides (P2-P3, PC - 2, PC - 1) or in the parental proteins (N - 2, N - 1, C + 1, C + 2) (Fig. 8 and data not shown). The only exceptions were a marginally increased frequency of Tyr at P3 and Leu at PC ( $p = 0.046$ ) among proteasome-dependent ligands and Arg at PN - 2 among proteasome-independent ones ( $p = 0.043$ ). No obvious differences in charge or overall chemical character were observed between the two peptide sets. For instance, the aver-

age pI of the proteasome-independent and -dependent ligands sequenced in this study was  $10.45 \pm 2.07$  and  $10.42 \pm 1.29$ , respectively. Moreover both the proteasome-dependent and -independent peptides were detected along the whole HPLC chromatogram, indicating no obvious bias in the retention times of peptides from both sets. These results suggest that the proteasome dependence of B\*2705 ligands is largely unrelated to the structure of the peptides and to the flanking sequences of their parental proteins.

Analysis of the subcellular localization of the parental proteins (Fig. 8) showed no statistical differences between proteasome-dependent and -independent ligands. Although proteins of the exocytic route were similarly represented in the two groups, the three proteasome-independent ligands from these proteins came from their signal sequences, whereas the proteasome-dependent peptides from proteins of the exocytic compartment corresponded to internal sequences. The polypeptides giving rise to more than one of the sequenced ligands were counted only once in this and all analyses concerning parental proteins.

**Proteasome-independent Ligands Are Derived Mainly from Basic Proteins of Low Molecular Weight**—A striking difference with regard to protein size was observed among the parental proteins of proteasome-dependent and -independent ligands. With only one exception, proteasome-independent ligands from regions other than signal sequences were derived from low molecular mass (approximate range, 6–16.5 kDa) and basic (pI > 7.0) proteins, whereas proteasome-dependent ligands were derived mainly from proteins ranging from about 12 kDa to more than 200 kDa and showed little bias in the pI of the parental proteins (Fig. 9, A and B).

The size and pI distribution of the parental proteins of proteasome-dependent ligands reflected approximately that of the human proteome except for some over-representation of small basic proteins (21.4 versus 6.6%,  $p = 0.006$ ), which might be due to the preference of HLA-B27 for Arg-containing peptides (10). In contrast, the parental proteins of proteasome-independent ligands deviated much more significantly from the human proteome in both parameters ( $p = 5.1 \times 10^{-32}$  for small basic proteins) because small basic proteins account for only 6.6% of the human proteins (Fig. 9, C and D).

Because there was a close correlation between the expression level of HLA-B27 in the presence of epoxomicin after acid stripping and the percentage of proteasome-independent ligands and because these came mostly from small basic proteins, we wondered whether the parental proteins of known HLA-B27 ligands reflected the size distribution of the human proteome or that observed in our study. When the molecular mass of 145 parental proteins of a large set of HLA-B27 ligands from a published registry (10) was plotted versus the pI of the proteins, the observed distribution (Fig. 9E) was more similar to that obtained with the parental proteins of the proteasome-dependent and -independent ligands in this study (Fig. 9C) than to the human proteome (Fig. 9D).



## Proteasome-independent ligands

Sequence	S/P	Protein	AN	Localization	MW (Da)	pI
<b>9-mers (n=7)</b>						
ARLQTALLV *	P	Small inducible cytokine A22	O00626	Secreted	10581	9.07
IRAAPPPLF *	S, P	Cathepsin A	P10619	Lysosome	54466	6.16
KRLVVFDAAR	P	DNA-directed RNA polymerases I, II and III 7.0 kDa polypeptide	P53803	Nucleus	7004	9.27
LRVTPFILK	S	Chromosome 9 open reading frame 105	Q8N4H5	-	6035	9.69
QRKKAYADF	P	Cytochrome C oxidase polypeptide VIc precursor	P09669	Mitochondrion	8781	10.38
QRNVNVFKF	S	L-lactate dehydrogenase B chain	P07195	Cytosol	36507	5.72
RRFGDGLNF	P	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	Q13794	-	6030	10.30
<b>10-mers (n=5)</b>						
GRFNGQFKTY	P	40S ribosomal protein S21	P63220	Cytosol/Nucleus	9111	8.68
RRFVNVVPTF	P	<b>40S ribosomal protein S30</b>	<b>P62861</b>	Cytosol/Nucleus	6648	12.15
RRISGVDRYY	P	NADH-ubiquinone oxidoreductase MWFE subunit	O15239	Mitochondrion	8072	8.93
RRLLALFPGVA *	P	ERp57	P30101	ER	56782	5.98
RRLQIEDFEA	P	<b>NADH-ubiquinone oxidoreductase B16.6 subunit</b>	<b>Q9P0J0</b>	Mitochondrion	16567	8.24
<b>11-mers (n=6)</b>						
ARFSPDDKYSR	S	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3	Q9NPE3	Nucleus	7706	10.01
RRFVNVVPTFG	S	<b>40S ribosomal protein S30</b>	<b>P62861</b>	Cytosol/Nucleus	6648	12.15
RRLQIEDFEAR	P	<b>NADH-ubiquinone oxidoreductase B16.6 subunit</b>	<b>Q9P0J0</b>	Mitochondrion	16567	8.24
SRAGLQFPVGR	S, P	Histone H2A	Q16777	Nucleus	13857	10.90
VRLLLPGELAK	P	Histone H2B.a/g/h/k/l	P62807	Nucleus	13775	10.32
YRVTLNPPGTF	S	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B14.7	Q86Y39	Mitochondrion	14721	8.95
<b>12-mers (n=1)</b>						
RRFVNVVPTFGK	P	<b>40S ribosomal protein S30</b>	<b>P62861</b>	Cytosol/Nucleus	6648	12.15

## Proteasome-dependent ligands

Sequence		Protein	AN	Localization	MW (Da)	pI
<b>8-mers (n=1)</b>						
RRFFPYV	P	<b>Proteasome subunit beta type 1</b>	<b>P20618</b>	Cytosol/Nucleus	26489	8.27
<b>9-mers (n=18)</b>						
ARLFGIRAK	P	60S ribosomal protein L13	P26373	Cytosol/Nucleus	24130	11.65
ARLKEVLEY	P	<b>Farnesyl diphosphate synthase</b>	<b>Q96G29</b>	Cytosol	48275	5.83
FRYNGLIHR	P	60S ribosomal protein L28	P46779	Cytosol/Nucleus	15616	12.02
GRFSGLLGR	P	Interleukin-16	Q14005	Secreted	66646	5.67
GRIDKPIIK	S, P	60S ribosomal protein L8	P62917	Cytosol/Nucleus	27893	11.04
GRIPGIYGR	P	Structural maintenance of chromosomes 4-like 1 protein	Q9NTJ3	Cytosol/Nucleus	147182	6.37
GRLTKHTKF	P	60S ribosomal protein L36	Q9Y3U8	Cytosol/Nucleus	12122	11.59
IRLPSSQYNF	P	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	Q8TEM1	Nucleus	205124	6.33
KRFDDKYTL	P	Signal peptidase complex subunit 2	Q15005	ER	25002	8.69
KRFEGTLQR	P	Serine/threonine-protein kinase 38-like	Q9Y2H1	Cytosol	54002	6.36
KRYKSLVKY	P	<b>Farnesyl diphosphate synthase</b>	<b>Q96G29</b>	Cytosol	48275	5.83
LRNQSVFNF	P	Squalene synthetase	P37268	ER	48115	6.10
RRDFNHINV	S, P	60S ribosomal protein L9	P32969	Cytosol/Nucleus	21863	9.96
RRFFPYVYV	P	<b>Proteasome subunit beta type 1</b>	<b>P20618</b>	Cytosol/Nucleus	26489	8.27
RRYQKSTEL	P	Histone H3	Q71DI3	Nucleus	15388	11.27
SRFPEALRL	P	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	Q13200	Cytosol/Nucleus	100199	5.08
SLRLAIRNEF	S	ARMC6 protein	Q6NXXE6	-	51548	5.67
SRTPYHVNL	P	<b>Proteasome subunit beta type 2</b>	<b>P49721</b>	Cytosol/Nucleus	22836	6.52
<b>10-mers (n=8)</b>						
ARYGKSPYLY	P	Rab GDP dissociation inhibitor beta	P50395	Cytosol	50663	6.11
GRKAIQLEY	P	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	O43242	Cytosol/Nucleus	60977	8.47
HRFEQAFYTY	P	Nodal modulator 1	Q15155	Membrane	134293	5.54
HRFYGNSSY	P	Ras-GTPase-activating protein-binding protein 1	Q13283	Cytosol/Nucleus	52164	5.36
KRFSPVQHF	S	Copine-1	Q98829	Membrane	59059	5.52
KRQGRITLYGF	S	Histone H4	P62805	Nucleus	11236	11.36
NRFAGFGIGL	P	Solute carrier family 25, member 46	Q96AG3	Mitochondrion	46174	6.97
RRKDGVLVYF	S	60S ribosomal protein L23	P62829	Cytosol/Nucleus	14865	10.51
<b>11-mers (n=3)</b>						
ARNPSLKQQLF	P	ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial	P48201	Mitochondrion	14693	9.57
RRYLENGKETL	P	<b>HLA-B27 alpha chain precursor</b>	<b>P03989</b>	Membrane	40428	5.54
SRAGPLSGKKF	P	Probable RNA-dependent helicase p68	P17844	Nucleus	69148	9.06
<b>13-mers (n=1)</b>						
RRYLENGKETLQR	P	<b>HLA-B27 alpha chain precursor</b>	<b>P03989</b>	Membrane	40428	5.54

FIG. 8. Amino acid sequences of proteasome-independent and proteasome-dependent HLA-B27 ligands. Within each set peptides are ordered by size and alphabetically. Peptides that were reported previously as HLA-B\*2705 ligands (10, 74) are indicated with *P*. Peptides whose sequence was directly confirmed with synthetic peptides in this study are indicated with *S*. The corresponding parental proteins, their accession numbers (AN) in the Swiss-Prot database, cellular localization, molecular mass (MW), and theoretical isoelectric point (pI) are given. Proteasome-independent ligands arising from signal sequences are labeled with asterisks (\*). Polypeptides giving rise to more than one ligand are indicated in **boldface**. The total number of parental polypeptides of proteasome-independent and -dependent ligands was 16 and 28, respectively.

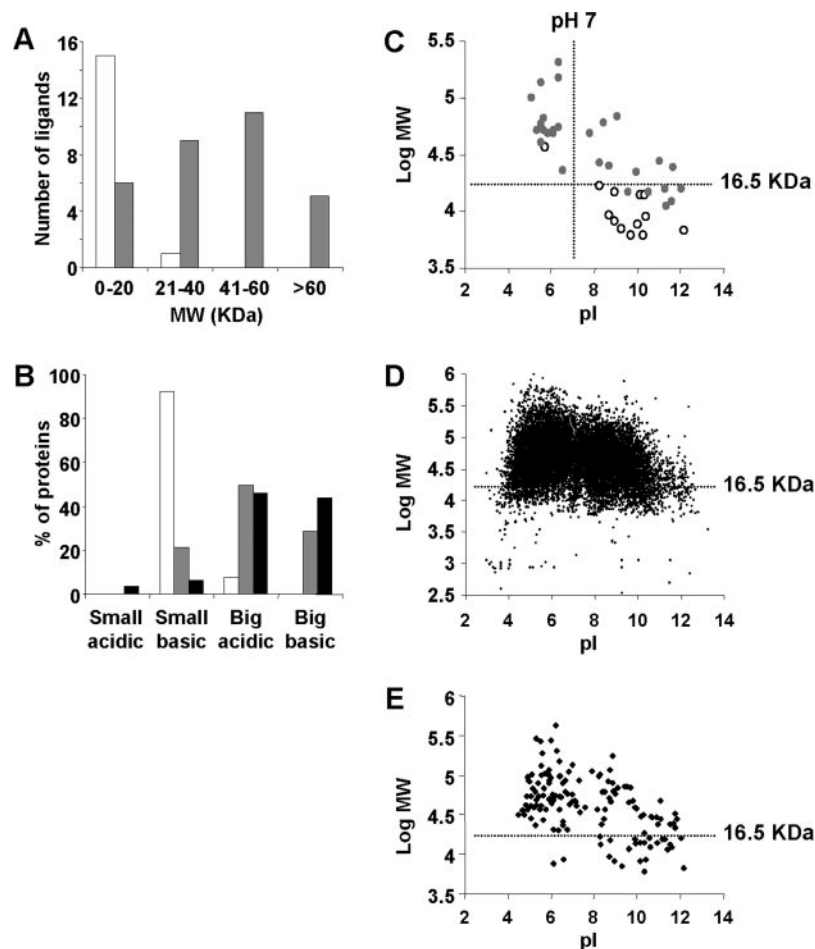


FIG. 9. **Proteasome-independent B\*2705 ligands are derived mainly from basic proteins of low molecular mass.** A, molecular mass of the parental proteins from proteasome-independent (white bars) and -dependent (gray bars) B\*2705 ligands. Bars represent the number of B\*2705 ligands arising from proteins within the specified molecular mass ranges. The three peptides derived from signal sequences were not included. B, distribution of size and isoelectric point of the parental proteins of proteasome-independent (white bars) and -dependent (gray bars) HLA-B\*2705 ligands. This distribution is compared with the corresponding distribution of these parameters in the human proteome (black bars). Proteins were classified as *small* (molecular mass,  $\leq 16.5$  kDa) and *big* (molecular mass,  $>16.5$  kDa). *Basic* and *acidic* refer to the theoretical pI of the proteins. The differences between the percentage of small basic, big acidic, and big basic parental proteins of proteasome-independent ligands and those of proteasome-dependent or proteins from the human proteome were statistically significant. No statistical differences were found between the two latter sets except for small basic proteins ( $p = 0.006$ ). C, the molecular mass of the parental proteins from proteasome-dependent (○) and -independent (●) B\*2705 ligands is plotted versus their theoretical isoelectric points. The value of 16.5 kDa corresponds to the second highest molecular mass (16.567 kDa) observed among parental proteins of proteasome-independent ligands derived from internal sequences. The three parental proteins of ligands matching signal sequences were not included. D, the same plot for 15,495 annotated human protein entries in the Swiss-Prot database (UniProtKB/Swiss-Prot). E, the same plot for 145 parental proteins from a registry of constitutive B\*2705 ligands (10).

Yet the percentage of small and basic parental proteins from the ligands sequenced in this study was 2.5-fold higher than among the parental proteins of known HLA-B27 ligands (43.2 and 17.2%, respectively;  $p = 0.0008$ ). Thus, in the peptide set analyzed in our study, characterized by high abundance and good labeling of the peptides, the percentage of proteasome-independent ligands might be overestimated relative to the whole HLA-B27-bound repertoire.

Two of the three proteasome-independent ligands that came from signal sequences of proteins of the exocytic route arose from big acidic proteins: IRAAPPPLF (cathepsin A; mo-

lecular mass,  $\approx 54$  kDa; pI of the protein, 6.16) and RRLALF-PGVA (ERp57; molecular mass,  $\approx 56.8$  kDa; pI of the protein, 5.98). These ligands are probably TAP-independent and processed in the ER because at least the first ligand is presented by B\*2705 in the TAP-deficient T2 cells.<sup>2</sup>

#### DISCUSSION

In this study we have 1) established a sensitive and reliable method to distinguish proteasome-dependent from -independent HLA-B27 ligands, 2) applied this method, together with MS-based peptide sequencing, to identify multiple li-

gands from both sets, and 3) demonstrated that a large majority of the proteasome-independent HLA-B27 ligands analyzed arise from basic proteins of low molecular mass, a subset that accounts for a small percentage of the human proteome.

A first and critical aspect of our study concerns the method used to assess proteasome dependence. Its reliability requires that, under our experimental conditions, the inhibition of the proteasome activity is achieved in a reproducible and essentially quantitative way. This is particularly important because epoxomicin is more effective in inhibiting the chymotrypsin- than the trypsin-like activity of the proteasome (58). To account for this, experiments were performed at various epoxomicin concentrations, the highest of which should almost totally inhibit both proteasomal activities (58). In our experiments all but one of the peptides assigned as proteasome-dependent presented a similar pattern of virtually total inhibition of labeling with 1  $\mu\text{M}$  epoxomicin. At this concentration, the chymotrypsin-like activity of the proteasome should be totally inhibited, but some trypsin-like activity might remain. The single exception found in this set required 2.5  $\mu\text{M}$  epoxomicin to reach total inhibition.

It might be argued that the decreased labeling of many of the peptides assigned as proteasome-independent in the presence of epoxomicin could be due to partial inhibition of the proteasome. There are several reasons why we consider that this possibility is very unlikely. First, a majority (68.4%) of the proteasome-independent peptides analyzed at various concentrations of the inhibitor showed a similar decrease of labeling at all the concentrations tested or at least at the two higher concentrations, which would not be expected if the decrease were due to partial inhibition of the proteasome. Second, as mentioned above, at the highest concentration of epoxomicin used in our experiments both the chymotrypsin- and the trypsin-like activities are almost completely inhibited (58). Although the caspase-like activity still remains, it is very unlikely that, in the absence of the other activities, this may play any significant role in the generation of HLA-B27 ligands. The caspase-like activity of the proteasome would preferentially generate peptides with C-terminal acidic residues, which are not allowed for HLA-B27 binding (10). Third, TAP-independent peptides derived from signal sequences of proteins of the exocytic route also showed decreased labeling when isolated from epoxomicin-treated cells, although these ligands are generated in a proteasome-independent way. Fourth, similar results were obtained with MG132, which inhibits the three proteasomal activities (59). It is unlikely that two chemically different inhibitors fail to fully inhibit the generation of the same proteasome-dependent ligands while completely blocking the rest. Fifth, there is an alternative explanation to the decreased labeling of peptides in the presence of epoxomicin: a variable reduction of labeling is expected for many proteins when exposing cells to epoxomicin because proteasome inhibition alters the rate of protein syn-

thesis (60). Thus, ligands derived from proteins whose synthesis rate is decreased in these conditions will be worse labeled when isolated from epoxomicin-treated cells even if these ligands are generated in a proteasome-independent way. Indeed both the reduced labeling of TAP-independent ligands and the similar effect observed with both epoxomicin and MG132 would be expected if decreased labeling of the peptides is a consequence of the inhibition of the proteasome at the expression level or synthesis rate of the parental proteins.

The increased labeling of three proteasome-independent ligands might also be explained if they are derived from proteins whose expression is increased in response to epoxomicin. For instance, increased expression of stress response proteins upon proteasome inhibition has been reported (61, 62). Increased labeling of peptide ligands could also result directly from the inhibition of the proteasome because this protease is known to destroy some peptide epitopes (62–64).

The similar structural features of the peptides from both subsets suggest that the nature of the HLA-B27 ligands is mainly determined by the requirements of stable interaction with the HLA molecule and not by the origin of the peptide. This result was not necessarily expected *a priori* because most of the peptide motifs of HLA-B27 at individual positions, except Arg at P2, consist of multiple residues rather than a single one. For instance, the C-terminal peptide motif of B\*2705 consists of basic, aliphatic, and aromatic residues (10). Because the C-terminal residue of MHC class I ligands is directly generated by the proteasome (65), alternative proteases, or incomplete inhibition of the trypsin-like activity of the proteasome, could alter the relative frequencies of the C-terminal residues; this was not observed except for a marginal increase of Leu among proteasome-dependent ligands, which should be reassessed with a higher number of peptide sequences. Differences in the flanking sequences of HLA-B27 ligands could arise from the fact that different proteases may be affected in distinct ways by residues flanking their cleavage sites. However, at the N-terminal end of the peptide, putative specificity differences among degrading enzymes may be obscured by amino peptidase-mediated trimming that adjusts many MHC class I ligands to the appropriate size and N-terminal motif (12, 19, 21, 66). Our results are also consistent with the previous suggestion that proteasome-independent ligands are generated by a protease of relaxed specificity or by multiple proteases (23). Some but no dramatic differences in the cellular origin of the parental proteins were apparent. It was remarkable that a number of proteasome-independent ligands arose from mitochondrial proteins of the respiratory chain, raising the interesting possibility of a putative mitochondrial processing of these ligands, in line with previous speculations (68) and with the finding that the same protein expressed in the cytosol or in the mitochondria produced different MHC class I-restricted peptide epitopes (69). In addition, proteasome-independent ligands derived from



internal sequences of secreted proteins were not found. However, a putative correlation between the subcellular origin of the parental proteins and the proteasome dependence of the MHC class I ligands should be substantiated with significantly higher peptide numbers.

The main finding of our study was that, with few exceptions, proteasome-independent ligands arose from basic proteins of low molecular mass, whereas proteasome-dependent ligands arose from a protein set whose size and pI distribution was much more similar to those of the human proteome. The few exceptions found among proteasome-independent ligands were of two kinds. The first exception was peptides arising from signal sequences of large and/or non-basic proteins. Although some such ligands are TAP-dependent and may require proteasomal processing (26, 27), a majority is TAP-independent and is presumably generated in the lumen of the ER (24, 25). Indeed two of the proteasome-independent ligands from signal sequences found in this study are expressed on HLA-B27 transfectants of the TAP-deficient T2 cells.<sup>2</sup> The second exception concerns a lactate dehydrogenase (LDH)-B-derived peptide. A very similar ligand, matching a sequence of the LDH-A subunit, was also reported as proteasome-independent (23). LDH is normally degraded by the lysosomal proteolytic pathway (70). In addition, LDH-A is monoubiquitinated and targeted to lysosomal degradation under conditions of oxidative stress (71), raising the possibility of a putative lysosomal origin of HLA-B27 ligands derived from LDH; this deserves further analysis. The differences in pI found among the parental proteins of proteasome-independent and -dependent ligands did not apply to the ligands themselves because the pI of both peptide sets was very similar.

It might be argued that the 50 ligands whose proteasome dependence was determined in this study are a very small portion of the whole B27-bound peptide repertoire, which, as for any MHC class I molecule, consists of several thousands of peptides (8). That the percentage of proteasome-independent peptides was similar to the percentage of surface re-expression of HLA-B27 in the presence of epoxomicin after acid stripping suggests that this data set may be approximately representative of the bulk of the B27-bound peptide pool. However, the percentage of small basic parental proteins in the data set analyzed in this study (a total of 44 polypeptides) was 2.5-fold higher than the corresponding percentage among the 145 parental proteins of known HLA-B27 ligands from a published registry (10). A possible explanation for this discordance is that our data set was limited by the requirements of high intensity and significant labeling of the corresponding ion peaks, and it is likely to consist of abundant peptides in the B27-bound pool. A majority of the MHC class I ligands are presented in very low amounts and are not easily amenable to this analysis. Thus, it is possible that our data set may represent more closely the percentage of proteasome-independent and -dependent ligands among the

most abundant peptides than among the whole B27-bound pool.

The strong bias observed among proteasome-independent ligands toward small and basic parental proteins was not seen in a previous study (23). However, as already noted, that study was based on acid stripping and re-expression of HLA-B27 in the presence of proteasome inhibitors, and removal of previously synthesized peptides from the cell surface was only indirectly assessed by flow cytometry of acid-stripped HLA-B27. Whereas acid washing can remove the majority of peptides from the cell surface, flow cytometry cannot properly assess their quantitative removal prior to inhibition of the proteasome. If peptide removal were not complete, this might lead to misassignment of some peptides as proteasome-independent. Indeed one of the peptides that in our study was clearly proteasome-dependent (NRFAGFGIGL; see Fig. 4) was reported in that study (23) as generated in the presence of proteasome inhibitors.

Our observed bias of proteasome-independent HLA-B27 ligands toward arising from proteins of small size demonstrates the existence of a hitherto unnoticed non-proteasomal proteolytic pathway that makes a significant contribution to the HLA-B27-bound peptide repertoire. The basic character of these proteins might also be a specificity feature of this non-proteasomal activity or might just be a consequence of the preference of HLA-B27 for basic peptides. B27 ligands contain at least an Arg residue at P2 and frequently additional Arg or other basic residues at P1 and PC. Acidic residues are not allowed or are very disfavored at multiple positions such as P1, P2, P3, and PC (10). Thus, small basic proteins, due to their higher frequency of basic residues, are likely to generate more peptides with these features than small acidic proteins. Obviously this difference would not apply to larger proteins, which could contain sequences compatible with HLA-B27 ligands even if the protein has an overall acidic character. In addition, small basic proteins ( $\leq 16.5$  kDa) are 2-fold more abundant than small acidic proteins in the human proteome (6.6 and 3.4%, respectively).

It seems unlikely that lysosomal degradation is a main source of proteasome-independent HLA-B27 ligands. Whereas some lysosomal activities may occasionally generate MHC class I ligands, as demonstrated in dendritic cells (31) and hypothesized in this study for LDH-derived ligands, it is clear that, globally, the lysosomal degradation pathway does not explain the observed bias toward small parental proteins because lysosomal targeting and degradation is not size-dependent (72). However, we cannot rule out the possibility that lysosomal or Golgi proteases might contribute to a small extent to the HLA-B27-bound peptide repertoire. The cytosolic protease TPPII (17) might seem a more likely candidate for proteasome-independent HLA-B27 ligands. This enzyme has endopeptidase activity (17, 18) and can generate class I epitopes (29, 30). Actually it was recently proposed that it is the major protease capable of processing peptides

longer than 14 residues (20). TPPII cleaves after Lys residues but, at least *in vitro*, also after non-basic residues (17). Therefore, the absence of a bias toward C-terminal Lys residues among the proteasome-independent B\*2705 ligands does not argue against a role of TPPII in their generation. Whether TPPII can directly generate MHC class I ligands from proteins of the size observed in this study (*i.e.* about 6–16.5 kDa) or might work on shorter protein fragments produced by other non-proteasomal endopeptidases remains to be explored. However, unlike the effect of epoxomicin, TPPII inhibition with its specific inhibitor butabindide did not impair the surface re-expression of HLA-B27 after acid stripping.<sup>3</sup> This is in contrast to published evidence for other HLA class I molecules (18), but it is in full agreement with the recent observation that small interfering RNA-mediated TPPII inhibition has no effect on the generation of properly folded MHC class I proteins (20), implying that this enzyme is not required for most MHC class I antigen presentation. Our result suggests that TPPII is probably not responsible for the generation of the bulk of proteasome-independent HLA-B27 ligands. Thus, the enzyme(s) involved in the generation of this peptide subset remains to be identified, and efforts toward this aim are currently ongoing.

Finally we have not addressed the role of the non-proteasomal pathway described in this study for class I molecules other than HLA-B27. However, we examined the parental proteins of a reported series of HLA-B35 (73) and HLA-B14 (56) ligands. These two allotypes show a significantly higher-proteasome dependence than HLA-B27 in acid stripping experiments (Ref. 23 and Footnote 4, respectively).<sup>4</sup> For both B35 and B14 ligands, the percentage of small ( $\leq 16.5$  kDa) and basic parental proteins (6.9 and 9.1%, respectively) was close to the corresponding percentage of these proteins in the human proteome (6.6%) as expected from the strong proteasome dependence of both allotypes. Analysis of proteasome-dependent and -independent ligands of non-B27 class I molecules with a proteasome-dependence comparable to HLA-B27 is currently under way.

**Acknowledgments**—We thank Anabel Marina and Juan P. Albar (Proteomics Department, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa and Centro Nacional de Biotecnología, respectively) and the technical staff for assistance in MS and Manuel Ramos (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain) for sharing unpublished data. We especially thank Hidde Ploegh (Whitehead Institute, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA) and Peter van Ender (Université René Descartes, Hôpital Necker, Paris, France) for useful critiques.

\* This work was supported by Ministry of Science and Technology Grants SAF2003-02213 and SAF2005-03188, Comunidad Autónoma de Madrid Grant 08.3/0005/2001.1, and an institutional grant from the Fundación Ramón Areces (to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be

hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ The on-line version of this article (available at <http://www.mcponline.org>) contains supplemental material.

‡ To whom correspondence should be addressed: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain. Tel.: 34-91-497-8050; Fax: 34-91-497-8087; E-mail: [aldecastro@cbm.uam.es](mailto:aldecastro@cbm.uam.es).

## REFERENCES

- Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996) Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* **5**, 103–114
- Hughes, E. A., and Cresswell, P. (1998) The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr. Biol.* **8**, 709–712
- Lindquist, J. A., Jensen, O. N., Mann, M., and Hammerling, G. J. (1998) ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J.* **17**, 2186–2195
- Morrice, N. A., and Powis, S. J. (1998) A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Curr. Biol.* **8**, 713–716
- Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P. J., Sadasivan, B., Herberg, J. A., Granda, A. G., Riddell, S. R., Tampe, R., Spies, T., Trowsdale, J., and Cresswell, P. (1997) A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* **277**, 1306–1309
- Park, B., Lee, S., Kim, E., Cho, K., Riddell, S. R., Cho, S., and Ahn, K. (2006) Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell* **127**, 369–382
- Huczko, E. L., Bodnar, W. M., Benjamin, D., Sakaguchi, K., Zhu, N. Z., Shabanowitz, J., Henderson, R. A., Appella, E., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. (1993) Characteristics of endogenous peptides eluted from the class I MHC molecule HLA-B7 determined by mass spectrometry and computer modeling. *J. Immunol.* **151**, 2572–2587
- Engelhard, V. H. (1994) Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 181–207
- Hickman, H. D., Luis, A. D., Buchli, R., Few, S. R., Sathiamurthy, M., VanGundy, R. S., Giberson, C. F., and Hildebrand, W. H. (2004) Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J. Immunol.* **172**, 2944–2952
- Lopez de Castro, J. A., Alvarez, I., Marcilla, M., Paradela, A., Ramos, M., Sesma, L., and Vazquez, M. (2004) HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens* **63**, 424–445
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A. L. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**, 761–771
- Rock, K. L., York, I. A., Saric, T., and Goldberg, A. L. (2002) Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv. Immunol.* **80**, 1–70
- Dick, L. R., Aldrich, C., Jameson, S. C., Moomaw, C. R., Pramanik, B. C., Doyle, C. K., DeMartino, G. N., Bevan, M. J., Forman, J. M., and Slaughter, C. A. (1994) Proteolytic processing of ovalbumin and  $\beta$ -galactosidase by the proteasome to a yield antigenic peptides. *J. Immunol.* **152**, 3884–3894
- Kessler, J. H., Beekman, N. J., Bres-Vloemans, S. A., Verdijk, P., van Veelen, P. A., Kloosterman-Joosten, A. M., Vissers, D. C., ten Bosch, G. J., Kester, M. G., Sijts, A., Drijfhout, J. W., Ossendorp, F., Offringa, R., and Melief, C. J. (2001) Efficient identification of novel HLA-A\*0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.* **193**, 73–88
- Paradela, A., Alvarez, I., Garcia-Peydro, M., Sesma, L., Ramos, M., Vazquez, J., and Lopez de Castro, J. A. (2000) Limited diversity of peptides related to an alloreactive T cell epitope in the HLA-B27-bound peptide repertoire results from restrictions at multiple steps along the processing-loading pathway. *J. Immunol.* **164**, 329–337
- Yague, J., Alvarez, I., Rognan, D., Ramos, M., Vazquez, J., and Lopez de Castro, J. A. (2000) An N-acetylated natural ligand of human histocom-

<sup>3</sup> M. Marcilla and J. A. López de Castro, unpublished observations.

<sup>4</sup> E. Merino and J. A. López de Castro, unpublished observations.

- patibility leukocyte antigen (HLA)-B39. Classical major histocompatibility complex class I proteins bind peptides with a blocked NH<sub>2</sub> terminus in vivo. *J. Exp. Med.* **191**, 2083–2092
17. Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K., and Niedermann, G. (1999) A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* **283**, 978–981
  18. Reits, E., Neijssen, J., Herberts, C., Benckhuijsen, W., Janssen, L., Drijfhout, J. W., and Neefjes, J. (2004) A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity* **20**, 495–506
  19. York, I. A., Chang, S. C., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. (2002) The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8–9 residues. *Nat. Immunol.* **3**, 1177–1184
  20. York, I. A., Bhutani, N., Zenzian, S., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. (2006) Tripeptidyl peptidase II is the major peptidase needed to trim long antigenic precursors, but is not required for most MHC class I antigen presentation. *J. Immunol.* **177**, 1434–1443
  21. Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., Lopez, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., and Van Endert, P. M. (2005) Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* **6**, 689–697
  22. Vinitsky, A., Anton, L. C., Snyder, H. L., Orlowski, M., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. (1997) The generation of MHC class I-associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors: involvement of non-proteasomal cytosolic proteases in antigen processing. *J. Immunol.* **159**, 554–564
  23. Luckey, C. J., Marto, J. A., Partridge, M., Hall, E., White, F. M., Lippolis, J. D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. (2001) Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors. *J. Immunol.* **167**, 1212–1221
  24. Henderson, R. A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. (1992) HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* **255**, 1264–1266
  25. Wei, M. L., and Cresswell, P. (1992) HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* **356**, 443–446
  26. Aldrich, C. J., DeCloux, A., Woods, A. S., Cotter, R. J., Soloski, M. J., and Forman, J. (1994) Identification of a Tap-dependent leader peptide recognized by alloreactive T cells specific for a class Ib antigen. *Cell* **79**, 649–658
  27. Bland, F. A., Lemberg, M. K., McMichael, A. J., Martoglio, B., and Braud, V. M. (2003) Requirement of the proteasome for the trimming of signal peptide-derived epitopes presented by the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule HLA-E. *J. Biol. Chem.* **278**, 33747–33752
  28. Snyder, H. L., Bacik, I., Bennink, J. R., Kearns, G., Behrens, T. W., Bachi, T., Orlowski, M., and Yewdell, J. W. (1997) Two novel routes of transporter associated with antigen processing (TAP)-independent major histocompatibility complex class I antigen processing. *J. Exp. Med.* **186**, 1087–1098
  29. Seifert, U., Marañón, C., Shmueli, A., Desoutter, J. F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., Weinschenk, T., Schild, H., Laderach, D., Galy, A., Haas, G., Kloetzel, P. M., Reiss, Y., and Hosmalin, A. (2003) An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* **4**, 375–379
  30. Guil, S., Rodriguez-Castro, M., Aguilar, F., Villasevil, E. M., Anton, L. C., and Del Val, M. (2006) Need for tripeptidyl-peptidase II in major histocompatibility complex class I viral antigen processing when proteasomes are detrimental. *J. Biol. Chem.* **281**, 39925–39934
  31. Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M., and Rock, K. L. (2004) Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21**, 155–165
  32. Gil-Torregrosa, B. C., Castano, A. R., and Del Val, M. (1998) Major histocompatibility complex class I viral antigen processing in the secretory pathway defined by the trans-Golgi network protease furin. *J. Exp. Med.* **188**, 1105–1116
  33. Gil-Torregrosa, B. C., Castano, A. R., Lopez, D., and Del Val, M. (2000) Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic* **1**, 641–651
  34. Zhang, Y., Kida, Y., Kuwano, K., Misumi, Y., Ikehara, Y., and Arai, S. (2001) Role of furin in delivery of a CTL epitope of an anthrax toxin-fusion protein. *Microbiol. Immunol.* **45**, 119–125
  35. Leonhardt, R. M., Keusekotten, K., Bekpen, C., and Knittler, M. R. (2005) Critical role for the tapasin-docking site of TAP2 in the functional integrity of the MHC class I-peptide-loading complex. *J. Immunol.* **175**, 5104–5114
  36. Ohsumi, Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 211–216
  37. Yewdell, J. W., Anton, L. C., and Bennink, J. R. (1996) Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules. *J. Immunol.* **157**, 1823–1826
  38. Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770–774
  39. Princiotta, M. F., Finzi, D., Qian, S. B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgeit, F., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. (2003) Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* **18**, 343–354
  40. Benham, A. M., Gromme, M., and Neefjes, J. (1998) Allelic differences in the relationship between proteasome activity and MHC class I peptide loading. *J. Immunol.* **161**, 83–89
  41. Tran, T. M., Horejsi, V., Weinreich, S., Pla, M., Breur, B. S., Capkova, J., Flieger, M., Ivanyi, P., and Ivaskova, E. (2000) Strong association of HLA-B27 heavy chain with  $\beta_2$ -microglobulin. *Hum. Immunol.* **61**, 1197–1201
  42. Tran, T. M., Ivanyi, P., Hilgert, I., Brdicka, T., Pla, M., Breur, B., Flieger, M., Ivaskova, E., and Horejsi, V. (2001) The epitope recognized by pan-HLA class I-reactive monoclonal antibody W6/32 and its relationship to unusual stability of the HLA-B27/ $\beta_2$ -microglobulin complex. *Immunogenetics* **53**, 440–446
  43. Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 376–386
  44. Meiring, H. D., Kuipers, B., van Gaans-van den Brink JA, Poelen, M. C., Timmermans, H., Baart, G., Brugghe, H., van Schie, J., Boog, C. J., de Jong, A. P., and van Els, C. A. (2005) Mass tag-assisted identification of naturally processed HLA class II-presented meningococcal peptides recognized by CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **174**, 5636–5643
  45. Meiring, H. D., Soethout, E. C., Poelen, M. C., Mooibroek, D., Hoogerbrugge, R., Timmermans, H., Boog, C. J., Heck, A. J., de Jong, A. P., and van Els, C. A. (2006) Stable isotope tagging of epitopes: a highly selective strategy for the identification of major histocompatibility complex class I-associated peptides induced upon viral infection. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 902–913
  46. Ringrose, J. H., Meiring, H. D., Speijer, D., Feltkamp, T. E., van Els, C. A., de Jong, A. P., and Dankert, J. (2004) Major histocompatibility complex class I peptide presentation after Salmonella enterica serovar typhimurium infection assessed via stable isotope tagging of the B27-presented peptide repertoire. *Infect. Immun.* **72**, 5097–5105
  47. Jardetzky, T. S., Lane, W. S., Robinson, R. A., Madden, D. R., and Wiley, D. C. (1991) Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* **353**, 326–329
  48. Zemmour, J., Little, A. M., Schendel, D. J., and Parham, P. (1992) The HLA-A,B “negative” mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J. Immunol.* **148**, 1941–1948
  49. Calvo, V., Rojo, S., Lopez, D., Galocha, B., and Lopez de Castro, J. A. (1990) Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism. *J. Immunol.* **144**, 4038–4045
  50. Ellis, S. A., Taylor, C., and McMichael, A. (1982) Recognition of HLA-B27 and related antigens by a monoclonal antibody. *Hum. Immunol.* **5**, 49–59
  51. Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F., and Ziegler, A. (1978) Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetic analysis. *Cell* **14**, 9–20
  52. Kim, K. B., Myung, J., Sin, N., and Crews, C. M. (1999) Proteasome



- inhibition by the natural products epoxomicin and dihydroeponeymycin: insights into specificity and potency. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 3335–3340
53. Nuchtern, J. G., Bonifacio, J. S., Biddison, W. E., and Klausner, R. D. (1989) Brefeldin A implicates egress from endoplasmic reticulum in class I restricted antigen presentation. *Nature* **339**, 223–226
  54. Vázquez, M. N., and Lopez de Castro, J. A. (2005) Similar cell surface expression of  $\beta$ 2-microglobulin-free heavy chains by HLA-B27 subtypes differentially associated with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **52**, 3290–3299
  55. Paradela, A., Garcia-Peydro, M., Vazquez, J., Rognan, D., and Lopez de Castro, J. A. (1998) The same natural ligand is involved in allorecognition of multiple HLA-B27 subtypes by a single T cell clone: role of peptide and the MHC molecule in alloreactivity. *J. Immunol.* **161**, 5481–5490
  56. Merino, E., Montserrat, V., Paradela, A., and Lopez de Castro, J. A. (2005) Two HLA-B14 subtypes (B\*1402 and B\*1403) differentially associated with ankylosing spondylitis differ substantially in peptide specificity, but have limited peptide and T-cell epitope sharing with HLA-B27. *J. Biol. Chem.* **280**, 35868–35880
  57. Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., and Lempicki, R. A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, P3
  58. Kisselev, A. F., Callard, A., and Goldberg, A. L. (2006) Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J. Biol. Chem.* **281**, 8582–8590
  59. Bogoy, M., McMaster, J. S., Gaczynska, M., Tortorella, D., Goldberg, A. L., and Ploegh, H. (1997) Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the Escherichia coli homolog HsIV by a new class of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6629–6634
  60. Ding, Q., Dimayuga, E., Markesbery, W. R., and Keller, J. N. (2006) Proteasome inhibition induces reversible impairments in protein synthesis. *FASEB J.* **20**, 1055–1063
  61. Bush, K. T., Goldberg, A. L., and Nigam, S. K. (1997) Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J. Biol. Chem.* **272**, 9086–9092
  62. Anton, L. C., Snyder, H. L., Bennink, J. R., Vinitsky, A., Orlowski, M., Porgador, A., and Yewdell, J. W. (1998) Dissociation of proteasomal degradation of biosynthesized viral proteins from generation of MHC class I-associated antigenic peptides. *J. Immunol.* **160**, 4859–4868
  63. Luckey, C. J., King, G. M., Marto, J. A., Venkateswaran, S., Maier, B. F., Crotzer, V. L., Colella, T. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. (1998) Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol. *J. Immunol.* **161**, 112–121
  64. Chapiro, J., Claverol, S., Piette, F., Ma, W., Stroobant, V., Guillaume, B., Gairin, J. E., Morel, S., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (2006) Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J. Immunol.* **176**, 1053–1061
  65. Rock, K. L., and Goldberg, A. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 739–779
  66. Saveanu, L., Carroll, O., Hassainya, Y., and van Endert, P. (2005) Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunol. Rev.* **207**, 42–59
  67. Clauser, K. R., Baker, P., and Burlingame, A. L. (1999) Role of accurate mass measurement ( $\pm 10$  ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal. Chem.* **71**, 2871–2882
  68. Young, L., Leonhard, K., Tatsuta, T., Trowsdale, J., and Langer, T. (2001) Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* **291**, 2135–2138
  69. Yamazaki, H., Tanaka, M., Nagoya, M., Fujimaki, H., Sato, K., Yago, T., Nagata, T., and Minami, M. (1997) Epitope selection in major histocompatibility complex class I-mediated pathway is affected by the intracellular localization of an antigen. *Eur. J. Immunol.* **27**, 347–353
  70. Ohshita, T. (1993) Chromatographic analysis of lysosomal degradation of unlabeled native proteins in vitro by fluorescein isothiocyanate labeling. *Anal. Biochem.* **215**, 17–23
  71. Onishi, Y., Hirasaka, K., Ishihara, I., Oarada, M., Goto, J., Ogawa, T., Suzue, N., Nakano, S., Furochi, H., Ishidoh, K., Kishi, K., and Nikawa, T. (2005) Identification of mono-ubiquitinated LDH-A in skeletal muscle cells exposed to oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 799–806
  72. Klionsky, D. J., and Ohsumi, Y. (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 1–32
  73. Alvarez, I., Carrascal, M., Canals, F., Muixi, L., Abián, J., and Jaraquemada, D. (2007) The analysis of the HLA class I associated peptide repertoire in a hepatocellular carcinoma cell line reveals tumor-specific peptides as putative targets for immunotherapy. *Proteomics* **1**, 286–298
  74. Gomez, P., Montserrat, V., Marcilla, M., Paradela, A., and López de Castro, J. A. (2006) B\*2707 differs in peptide specificity from B\*2705 and B\*2704 as much as from HLA-B27 subtypes not associated to spondyloarthritis. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1867–1881
  75. Hiller, K., Schobert, M., Hundertmark, C., Jahn, D., and Munch, R. (2003) Calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3862–3865

# Identification of Endogenously Presented Peptides from *Chlamydia trachomatis* with High Homology to Human Proteins and to a Natural Self-ligand of HLA-B27\*<sup>§</sup>

Juan J. Cragnolini and José A. López de Castro<sup>‡</sup>

A strategy for the stable expression of proteins, or large protein fragments, from *Chlamydia trachomatis* into human cells was designed to identify bacterial epitopes endogenously processed and presented by HLA-B27. Fusion protein constructs in which the green fluorescent protein gene was placed at the 5'-end of the bacterial DNA primase gene or some of its fragments were transfected into B\*2705-C1R cells. One of these constructs, including residues 90–450 of the bacterial protein, was stably and efficiently expressed. Mass spectrometry-based comparative analysis of HLA-B27-bound peptide pools led to identification of three HLA-B27 ligands differentially presented in the transfectant cells. Sequencing of these peptides confirmed that they were derived from the bacterial DNA primase. One of them, spanning residues 211–221, showed 55% sequence identity with a known self-ligand of HLA-B27 derived from its own molecule. The other two bacterial ligands, P-(112–121) and P-(112–122), were derived from the same region and differed in length by one residue at the C terminus. Both peptides showed >50% identity with multiple human protein sequences that possessed the optimal peptide motifs for HLA-B27 binding. Thus, expression of proteins from arthritogenic bacteria in HLA-B27-positive human cells allows identifying bacterial peptides that are endogenously processed and presented by HLA-B27 and show molecular mimicry with known self-ligands of this molecule and human proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* 7:170–180, 2008.

*Chlamydia trachomatis*, an obligate intracellular parasite that primarily infects the urogenital epithelium, is one of the most common infectious agents in humans. *Chlamydia*-induced arthritis is the most frequent form of reactive arthritis (ReA)<sup>1</sup> in Western countries (1). Persistent forms of the bac-

teria, rather than actively growing forms, are found in chronically infected tissues and, presumably because they sustain chronic infection, are critical in the development of ReA. Persistent forms of *Chlamydia* are produced by differentiation of the metabolically active reticulate bodies in response to tryptophan starvation induced by interferon- $\gamma$  (2). Several studies (3, 4) have established that proteins involved in DNA replication are expressed during persistence and that the bacterial chromosome is continuously replicated.

Despite the multiple mechanisms used for *C. trachomatis* to evade the immune system, which include down-regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I and class II molecules (5–7) and persistence, the occurrence of CD4+ and CD8+ T cell responses is well established (8), and HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are found in patients with *Chlamydia*-induced ReA (9, 10). The joint role of HLA-B27 and *Chlamydia* infection in determining susceptibility to ReA, especially in its chronic form, suggests that molecular mimicry between bacterial and self-antigens presented by HLA-B27 may provide an autoimmune pathogenetic mechanism for this disease (11, 12). This is supported by studies in rats showing that immunization with HLA-B27 rendered the animals capable to mount a *Chlamydia*-specific CD8+ T cell response after *in vitro* stimulation with this bacteria (13). Moreover HLA-B27 transgenic rats activated an autoreactive B27-directed CTL response upon exposure to *C. trachomatis* (14). Although these studies show an immunological interplay between HLA-B27 and *Chlamydia*, it must be noted that molecular mimicry is only one of the possible mechanisms of autoimmunity. Actually the elusive nature of the concept of antigenic mimicry at a molecular level, because the T cell receptor may cross-react against structurally disparate epitopes (15, 16), and the difficulty of actually establishing a causative link between molecular mimicry and autoimmunity cast doubts on the actual relevance of this mechanism (17). Nevertheless cross-reactivity between chlamydial peptides and homologous peptides from the heart muscle-specific protein  $\alpha$ -myosin was shown to be involved in the pathogenesis of autoimmune myocarditis in mice (18).

To investigate the role of molecular mimicry in *Chlamydia*-induced HLA-B27-associated ReA, two experimental strategies have been undertaken. In the first one, chlamydial pep-

From the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid), Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain

Received, August 14, 2007, and in revised form, October 10, 2007

Published, MCP Papers in Press, October 13, 2007, DOI 10.1074/mcp.M700386-MCP200

<sup>1</sup> The abbreviations used are: ReA, reactive arthritis; CTL, cytotoxic T lymphocyte; GFP, green fluorescent protein; C1R, Hmy2.C1R; mAb, monoclonal antibody; MHC, major histocompatibility complex; Ab, antibody; P, primase.

tides recognized by HLA-B27-restricted CTLs from both transgenic mice and patients were identified by screening a panel of synthetic peptides with binding motifs and proteasome cleavage features compatible with presentation by HLA-B27 (9, 10). However, given the large cross-reactive potential of CTLs, the relationship of these peptides to naturally processed chlamydial epitopes is unknown. In a second approach a peptide derived from the cytoplasmic tail of HLA-B27 and other class I molecules was shown to be presented as an endogenously processed natural ligand of three HLA-B27 subtypes, B\*2702, B\*2704, and B\*2705, associated with spondyloarthritis and not by two subtypes, B\*2706 and B\*2709, weakly or not disease-associated. This peptide showed high homology with a sequence encompassing residues 211–222 of the DNA primase of *C. trachomatis*, and the corresponding chlamydial peptide was directly generated *in vitro* from a synthetic precursor by the 20 S proteasome (11). This study was the first to directly address the molecular mimicry between natural ligands of HLA-B27 arising from human self-proteins and chlamydial protein sequences. However, a critical test for the relevance of the DNA primase-derived peptide was to determine whether this peptide, or a closely related one, was actually processed and presented *in vivo* by HLA-B27. A direct molecular approach aiming at directly mapping chlamydial peptides presented by HLA-B27 in infected cells by biochemical methods is hardly feasible due to the exceedingly low expression of bacterial antigens on these cells as reported, for instance, with *Salmonella* (19, 20). In the case of *Chlamydia*, this approach is further complicated by the down-regulation of MHC class I expression induced by the bacteria shortly after infection (6, 7). Thus, we adopted an alternative strategy to ask the specific question of whether the DNA primase-(211–222) peptide, or closely related ones, could be generated and presented by HLA-B27 when the bacterial protein was endogenously expressed in the cell. To this end, we devised a method to endogenously and stably express a viable construct derived from the DNA primase of *C. trachomatis* and demonstrated the endogenous presentation of three peptides from this protein by HLA-B27 *in vivo*, including one spanning residues 211–221.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**DNA Primase Gene Constructs, Transfectants, and Monoclonal Antibodies**—Green fluorescent protein (GFP)-DNA primase fusion proteins were generated by fusing the cDNA of the DNA primase gene of *C. trachomatis* serovar L2 (CT794) (Advanced Biotechnologies, Columbia, MD), or truncated forms of this gene, in frame to the 3'-end of the GFP gene. All the DNA primase gene constructs were cloned into the pEGFP-C1 vector (BD Biosciences Clontech) in 5' EcoRI and 3' BamHI sites. Three gene constructs were made (see Fig. 1A): the complete DNA primase sequence, P-(1–595), a truncated form lacking the first 89 codons, P-(90–595), and a second truncated form lacking codons 1–89 and 451–595, P-(90–450). The chlamydial DNA primase cDNA was amplified by PCR using the following primers: for P-(1–595), 5'-TCTCTCTCGAATTCTATGTATTACACAGAAGAGAGC and 3'-TCTCTCTCGGATCCTTAAGAACTAAAGAAACCTTAAC; for

P-(90–595), 5'-TCTCTCTCGAATTCTATGTTCATGTTGATCTTGTGTCAG and 3'-TCTCTCTCGGATCCTTAAGAACTAAAGAAACCTTAAC; and for P-(90–450), 5'-TCTCTCTCGAATTCTATGTTCATGTTGATCTTGTGTCAG and 3'-TCTCTCTCGGATCCTTATCCTTCTGTAAGATTGCTTA.

Hmy2.C1R (C1R) is a human lymphoid cell line with low expression of its endogenous HLA class I molecules (21, 22). The GFP-DNA primase constructs were cotransfected with the RSV5 vector (23) carrying the hygromycin resistance gene (a kind gift of Dr. D. Jaraquemada, Autonomous University, Barcelona, Spain) at a 20:1 ratio in B\*2705-C1R transfectant cells (24) by electroporation at 300 mV and 960 microfarads. Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS (both from Invitrogen). Stable GFP or GFP-DNA primase transfectants were selected with 250  $\mu$ g/ml hygromycin (Invitrogen). The monoclonal antibody (mAb) W6/32 (IgG2a, specific for a monomorphic HLA-A, -B, -C determinant) (25) was used.

**Flow Cytometry**—Approximately  $10^6$  cells were washed twice in 200  $\mu$ l of PBS. The GFP-associated fluorescence was directly measured in a FACSCalibur instrument, and data were analyzed using CellQuest software (both from BD Biosciences).

**Immunoprecipitation and Western Blot**—About  $2 \times 10^6$  cells were lysed in Igepal CA-630 (Sigma) lysis buffer (0.5% Igepal, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM  $MgCl_2$ ) containing a mixture of protease inhibitors (Complete Mini, Roche Applied Science). After centrifugation to remove insoluble material, lysates were precleared with anti-rabbit IgG beads (TrueBlot, eBioscience, San Diego, CA) for 2 h. Immunoprecipitation was done by overnight incubation with the GFP-specific polyclonal Ab A6455 (Invitrogen) followed by incubation with anti-rabbit IgG beads for 1 h. All procedures were carried out at 4 °C with continuous shaking. Immunoprecipitates were washed three times with lysis buffer, boiled for 5 min in SDS sample buffer, subjected to SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Immunoblotting was done with the A6455 Ab and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (TrueBlot, eBioscience) at 1:10,000 and 1:5000 dilution, respectively. Antibodies were diluted in PBS-milk buffer (PBS, 5% milk, 0.1% Tween 20). The immunoblots were developed with the ECL immunodetection system (Amersham Biosciences).

**Isolation of HLA-B27-bound Peptides**—B\*2705-bound peptides were isolated from about  $10^{10}$  or, in one case,  $2 \times 10^{10}$  C1R-B\*2705 transfectant cells as described previously (26). Briefly cells were lysed in 1% Igepal CA-630 (Sigma), 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, in the presence of a mixture of protease inhibitors. After ultracentrifugation, the soluble fraction was subjected to affinity chromatography using the W6/32 mAb. HLA-B27-bound peptides were eluted with 0.1% aqueous TFA at room temperature, filtered through Centricon 3 devices (Amicon, Beverly, MA), concentrated, and subjected to reverse phase HPLC fractionation in a Waters Alliance system (Waters, Milford, MA) using a Vydac 218TP52-C18 column (Vydac, Hesperia, CA) at a flow rate of 100  $\mu$ l/min as previously described (27). Fractions of 50  $\mu$ l were collected and stored at –20 °C.

**Mass Spectrometry Analysis and Sequencing**—HPLC fractions were analyzed by MALDI-TOF MS using a Bruker Reflex™ mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with the SCOUT™ source operating in positive ion reflector mode as described previously (28). Briefly dried HPLC fractions were resuspended in 0.5  $\mu$ l of TA (33% aqueous acetonitrile, 0.1% TFA), deposited onto the MALDI plate, and allowed to dry at room temperature. Then 0.5  $\mu$ l of matrix solution ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in TA) at 2 mg/ml was added and allowed to dry again. MS spectra were processed using the MoverZ software (version 2001.02.03) (Genomic Solutions).

Alternatively a MALDI-TOF/TOF Instrument (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA) was used. In this case,



fractions were reconstituted with 0.6  $\mu$ l of TA, loaded onto an Opti-TOF™ 384-well MALDI insert (Applied Biosystems), and allowed to dry at room temperature. Then 0.6  $\mu$ l of the matrix solution (3 mg/ml) was added. These mass spectra were acquired in reflector positive mode and processed using the 4000 Series Explorer software version 3.5.

Peptide sequencing was carried out by quadrupole ion trap nano-ESI MS/MS in an LCQ Classic or LCQ DECA-XP instrument (Finnigan Thermoquest, San Jose, CA) using the Xcalibur 2.0 software after on-line chromatographic separation of samples as described previously (28). Alternatively sequencing was performed by MALDI-TOF/TOF. The acquisition method was MS/MS at 1 kV with collision-induced dissociation where the collision gas was atmospheric air and the precursor mass window was set as  $\pm 10$  Daltons. The parameter used for processing data was a signal-to-noise ratio of 10.

Interpretation of mass spectra was done manually but assisted by various software tools as follows. Manual inspection of the spectrum allowed us to determine a tentative sequence. This was used to screen the chlamydial DNA primase protein sequence (UniProtKB/Swiss-Prot accession number O84799). When a match was obtained, a list of theoretical fragment ions of the corresponding peptide sequence was generated using the MS-product tool available at the Protein Prospector tools web site: [prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/msprod.htm](http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/msprod.htm) (University of California, San Francisco, CA) as an assistance to match the putative candidate sequences to our experimental MS/MS spectrum. In addition, the corresponding synthetic peptide was made, and its MS/MS spectrum was used to confirm the manually assigned sequence of the chlamydial B27 ligand.

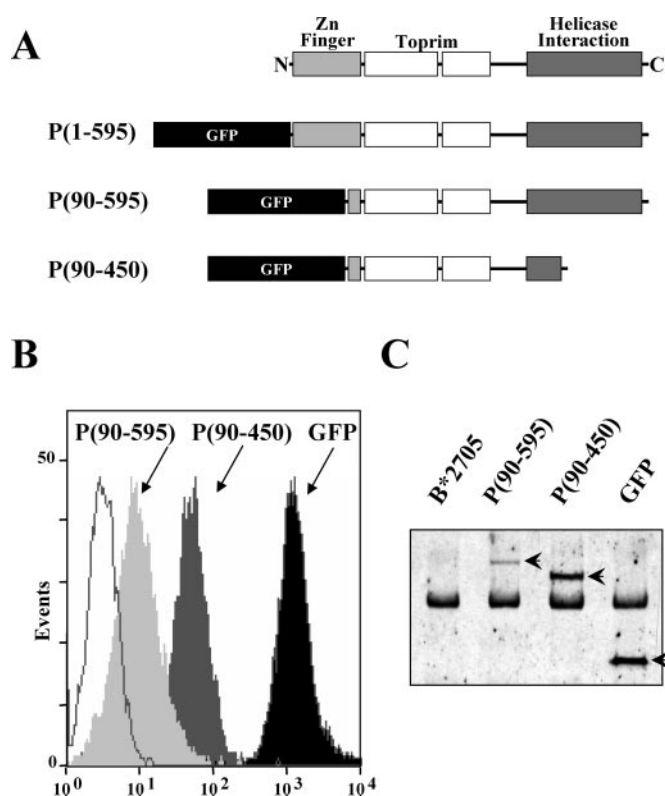
**Homology Searches in Human Databases**—The search for homologies between chlamydial peptides and human proteins was carried out in the UniProtKB database (release 54.0; July 24, 2007) at [www.expasy.org/sprot](http://www.expasy.org/sprot) using the Fasta 3 software (release 12.0; July 24, 2007) at [www.ebi.ac.uk/fasta](http://www.ebi.ac.uk/fasta).

**Stable Isotope Tagging and Proteasome Inhibition**—This was done essentially as described previously (29) with minor modifications. Briefly three batches of  $6 \times 10^8$  B\*2705-C1R transfectant cells expressing the chlamydial P-(90–450) fusion protein were separately cultured for 4 h in Dulbecco's modified Eagle's medium without Arg supplemented with 10% FCS. Then one flask was supplemented with standard [ $^{14}$ N]Arg (100  $\mu$ g/ml), the second flask was supplemented with 100  $\mu$ g/ml L-[guanido- $^{15}$ N<sub>2</sub>]Arg-HCl (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) in which two nitrogen atoms of the guanidinium group have been replaced with  $^{15}$ N, and the third flask was treated with a 20  $\mu$ M concentration of the irreversible proteasome inhibitor MG132 (Calbiochem) for 30 min prior to the addition of 100  $\mu$ g/ml  $^{15}$ N-tagged Arg to ensure that the proteasome was inhibited from the start of the labeling; the inhibitor was left for the complete labeling period. After 5 h, cells were washed twice in 20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, and stored at  $-70^\circ\text{C}$  for further processing. This labeling time was used because the much longer times required for quantitative protein labeling are not feasible due to the limited viability of cells in the presence of proteasome inhibitors.

**Synthetic Peptides**—These were obtained using standard N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl chemistry and purified by HPLC. The correct molecular mass of purified peptides was verified by MALDI-TOF MS.

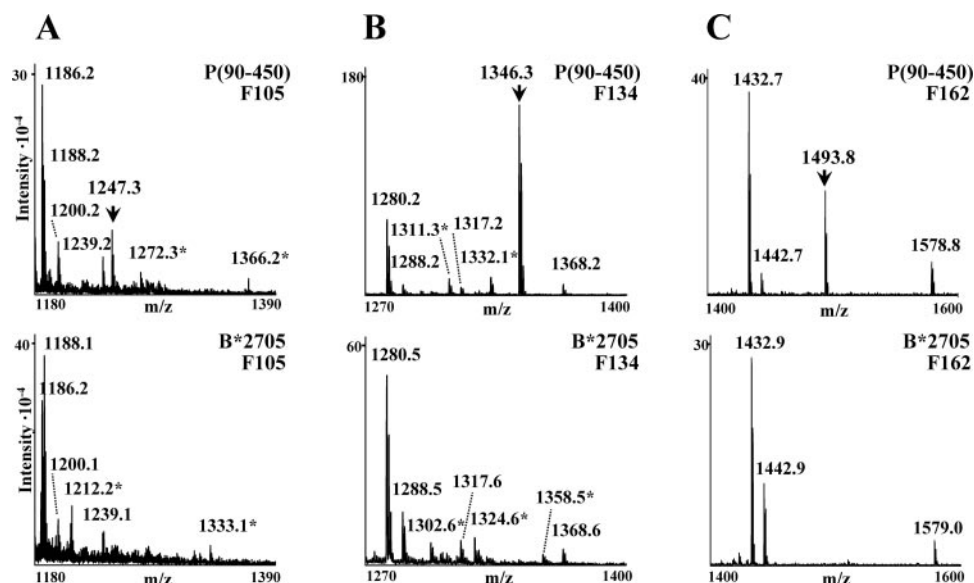
## RESULTS

**Expression of Bacterial DNA Primase Constructs in B\*2705-C1R Cells**—Stable transfectants expressing DNA primase protein sequences from *C. trachomatis* in HLA-B27-positive cells were required to analyze bacterial peptide presentation.



**FIG. 1. Expression of fusion protein constructs of the DNA primase of *C. trachomatis*.** A, three constructs were made in which GFP was placed at the N-terminal end of the whole DNA primase, P-(1–595), of a truncated form of the enzyme lacking residues 1–89, P-(90–595), and of another form lacking residues 1–89 and 451–595, P-(90–450). A schematic representation of the domain structure of the DNA primase is shown on top. Toprim, topoisomerase-primase domain. Residue assignments for the various domains are taken from the Pfam database (40) at [www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk). B, flow cytometry analysis of the GFP-associated fluorescence in B\*2705-C1R cells transfected with GFP alone, P-(90–595), and P-(90–450). Untransfected B\*2705-C1R cells were used as negative control (unshaded histogram). C, Western blot showing the expression of the P-(90–595) and P-(90–450) fusion proteins or GFP alone in stable transfectants of B\*2705-C1R cells. The proteins were immunoprecipitated from whole lysates of  $2 \times 10^6$  or  $0.5 \times 10^6$  cells for the fusion proteins or GFP, respectively, with the anti-GFP Ab and blotted with the same Ab. The relevant bands are marked with arrows. The nonspecific band corresponds to the Ab heavy chain.

Three fusion proteins were constructed in which GFP was fused to the N terminus of the complete DNA primase protein, P-(1–595), to a fragment lacking the N-terminal 89 residues, P-(90–595), and to a fragment lacking both the N-terminal 89 residues and the C-terminal 144 residues, P-(90–450). The deleted N-terminal and C-terminal regions included the DNA binding and helicase interaction domains of the DNA primase, respectively (Fig. 1A). The three constructs included the P-(211–222) sequence that was previously reported as homologous to a natural ligand of HLA-B27 derived from its own molecule (11). In preliminary experiments the three fusion proteins were efficiently expressed in transient transfectants



**FIG. 2. Identification of peptides specifically presented by HLA-B27 in P-(90-450) transfectant cells.** A, comparison of the MALDI-TOF MS spectra of HPLC fraction number 105 of the B\*2705-bound peptide pool from P-(90-450) transfectants and from B\*2705-C1R cells (B\*2705). All spectra were recorded and compared in the 800–2000  $m/z$  range, but for simplicity, only the 1180–1390 range is shown. The ion peak at  $m/z$  1247.3, labeled with an arrow, was not detected in the corresponding HPLC fraction of untransfected B\*2705-C1R cells or in the adjacent fractions (not shown). All other ion peaks were found in both peptide pools either in the same or in adjacent (labeled with an asterisk) fractions. B, comparison of the MALDI-TOF MS spectra of HPLC fraction number 134 of the B\*2705-bound peptide pool from P-(90-450) transfectants and from untransfected B\*2705-C1R cells. Only the 1270–1400  $m/z$  range is shown. The ion peak at  $m/z$  1346.3, labeled with an arrow, was not detected in the corresponding HPLC fraction of untransfected B\*2705-C1R cells or in the adjacent fractions (not shown). All other ion peaks were found in both peptide pools either in the same or in adjacent (labeled with an asterisk) fractions. C, comparison of the MALDI-TOF MS spectra of HPLC fraction number 162 of the B\*2705-bound peptide pool from P-(90-450) transfectants and from untransfected B\*2705-C1R cells. Only the 1400–1600  $m/z$  range is shown. The ion peak at  $m/z$  1493.8, labeled with an arrow, was not detected in the corresponding HPLC fraction of untransfected B\*2705-C1R cells or in the adjacent fractions (not shown). All other ion peaks were found in both peptide pools.

of COS and HeLa cells (data not shown). In contrast, stable transfectants in B\*2705-C1R cells were obtained with P-(90-595) and P-(90-450) but not with the complete bacterial protein P-(1-595).

The expression levels of the fusion proteins as assessed by flow cytometry were higher for P-(90-450) than for P-(90-595), although in both cases the fluorescence was much lower than in the transfectant expressing only GFP used as a control (Fig. 1B). The expression of the fusion proteins with the correct size in the corresponding transfectants was determined by immunoprecipitation with anti-GFP Ab and Western blot (Fig. 1C).

**Three Peptides Are Selectively Presented by HLA-B27 on C1R Cells Expressing the Chlamydial P-(90-450) Fusion Protein**—The search for HLA-B27 ligands derived from the bacterial DNA primase was carried out by comparative analysis of the HLA-B27-bound peptide pools isolated from B\*2705-C1R cells or transfectants of these cells expressing either GFP alone or P-(90-450). This transfectant was used, instead of the one expressing P-(90-595), due to its higher expression level of the fusion protein (Fig. 1). The strategy used was the same as that used previously for comparing HLA-B27 subtype-bound peptide repertoires (30, 31). HLA-B27-bound peptide pools were isolated by immunopurification of HLA-

B27 with the W6/32 mAb followed by acid extraction. The peptide pools were fractionated by HPLC under identical conditions and consecutive runs, and the peptide composition of individual fractions was analyzed by MALDI-TOF MS. To look for peptides specifically presented by HLA-B27 in cells expressing the chlamydial construct, the MS spectrum of each HPLC fraction of the B27-bound peptide pool from these cells was compared with the MS spectra of the correlative HPLC fraction of the control cell lines (untransfected and GFP-transfected B\*2705-C1R) as well as with the spectra of the previous and following fractions. This was done to account for small shifts in the retention times of individual peptides that might occur among distinct chromatographic runs.

In a survey of 1570 ion peaks from 150 HPLC fractions from each chromatography three ion peaks were detected in the P-(90-450) transfectant but not in the controls of untransfected (Fig. 2) or GFP-transfected (not shown) B\*2705-C1R: in HPLC fraction number 105 an ion peak with  $m/z$  1247.3, in fraction number 134 an ion peak with  $m/z$  1346.3, and in fraction number 162 an ion peak with  $m/z$  1493.8. The intensity of the 1346.3 ion peak was about 10 times higher than the intensity of each of the other two ion peaks. These intensities were calculated by adding the intensities of the corresponding ion peak from the two consecutive HPLC fractions in which



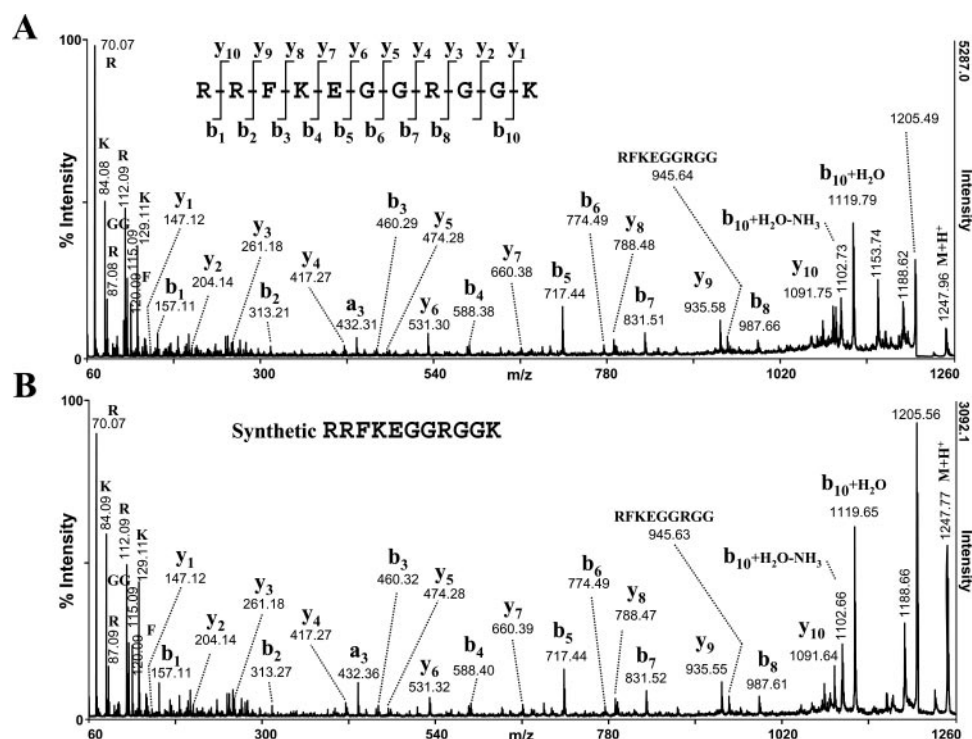


FIG. 3. Sequencing of the chlamydial B\*2705 ligand P-(211–221) from P-(90–450) transfectant cells. A, MALDI-TOF/TOF MS spectrum of the ion peak at  $m/z$  1247.3 in Fig. 2A. The assigned ions are indicated. The assigned sequence and the detected b and y fragment ions are diagrammatically shown. B, MALDI-TOF/TOF MS spectrum of the synthetic peptide with the sequence assigned in A.

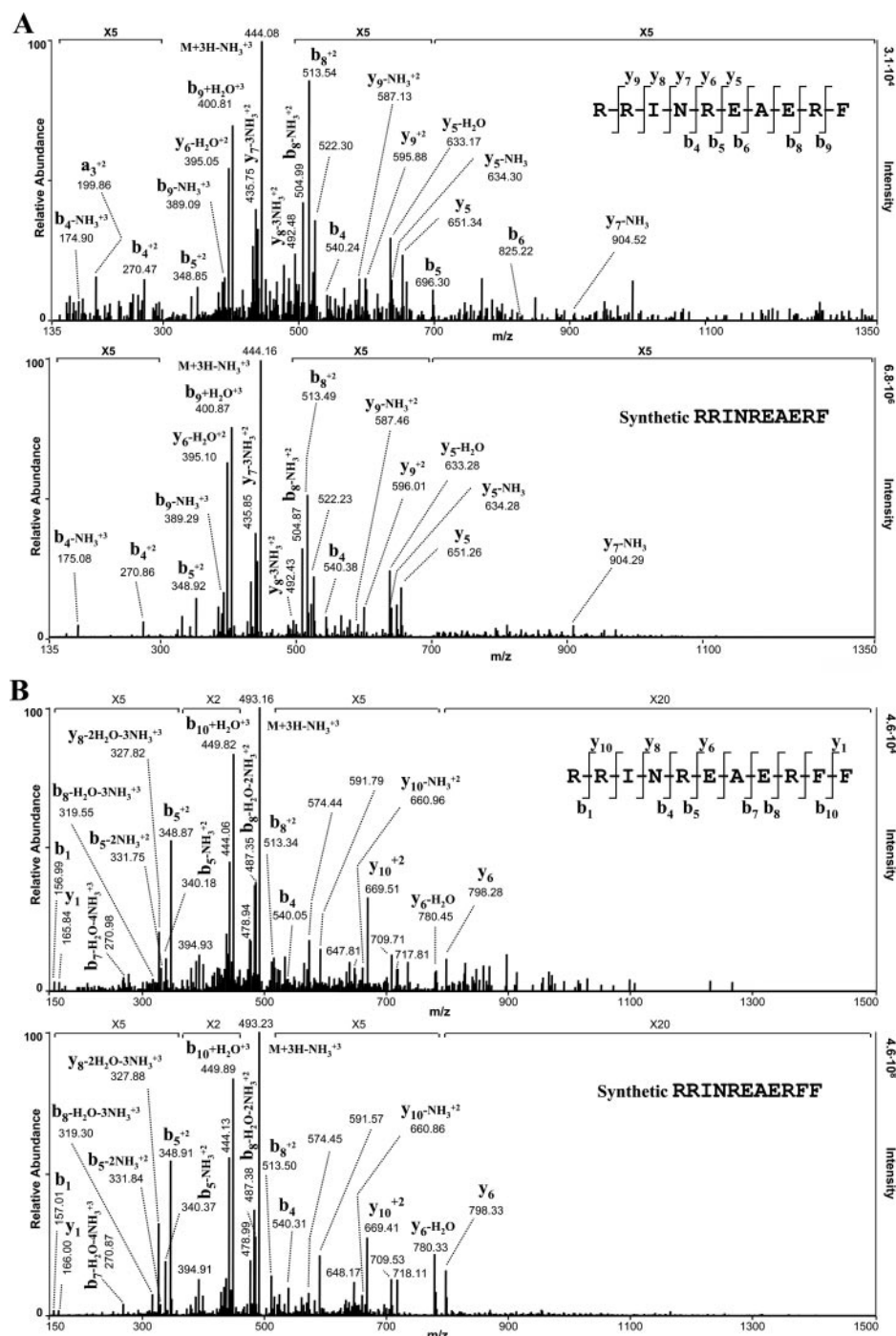
each of these peptides was detected. These results suggest that the direct comparison of HLA-B27-bound peptide repertoires by MS is sensitive enough to detect endogenously processed bacterial ligands of HLA-B27 upon transfection of the chlamydial protein construct and that at least three such ligands from the DNA primase are presented by HLA-B27 *in vivo*.

**The Chlamydial P-(211–221) Peptide Is Endogenously Processed and Presented by HLA-B27**—The peptide corresponding to the ion peak at  $m/z$  1247.3 in HPLC fraction 105 of the B\*2705-bound peptide pool from the P-(90–450) transfectant (Fig. 2A) was sequenced by MALDI-TOF/TOF from  $2 \times 10^9$  cell equivalents (Fig. 3). The sequence of this peptide was identical to that of residues 211–221 from the DNA primase of *C. trachomatis*. The assignment was validated by identity with the MALDI-TOF/TOF MS spectrum of the corresponding synthetic peptide (Fig. 3). A search in the human genome database failed to reveal identity with human proteins, confirming the bacterial origin of this peptide. P-(211–221) is just a residue shorter at the C terminus than the predicted bacterial homolog, P-(211–222), of the natural self-ligand of HLA-B27 derived from the cytoplasmic tail of its own molecule, B27-(309–320) (11). Thus, these results indicate that a chlamydial peptide with high sequence homology to a natural ligand of HLA-B27 derived from its own molecule is endogenously processed and presented by HLA-B27 in cells expressing the P-(90–450) fusion protein.

To rule out the possibility that a small amount of P-(211–222) might have escaped detection by MALDI-TOF MS, a specific search for this peptide was carried out. The elution position of the synthetic P-(211–222) peptide in the same conditions used to fractionate the B\*2705-bound peptide pool was determined to correspond to fraction number 119 or 121 in two independent chromatographic runs. The MALDI-TOF MS spectra of fractions 115–123 from the P-(90–450) peptide pool were examined at high resolution in the region corresponding to the  $m/z$  of P-(211–222) to look for small ion peaks consistent with this peptide, but they were not observed. The same HPLC fractions were also subjected to MS/MS fragmentation in the  $m/z$  range corresponding to the  $[M + 2H]^{2+}$ ,  $[M + 3H]^{3+}$ , and  $[M + 4H]^{4+}$  parent ions of P-(211–222). Again no fragmentation compatible with this peptide was observed. A similar strategy was used to search for the related P-(211–218) and P-(211–223) peptides, whose structural motifs were also compatible with HLA-B27 binding, but they were not detected in the B\*2705-bound peptide pool from P-(90–450). These results suggest that, within the detection limits of the techniques used in this study, the P-(211–218), P-(211–222), and P-(211–223) are not presented endogenously by HLA-B27 in cells expressing the P-(90–450) fusion protein.

**Two Additional Peptides from the Chlamydial DNA Primase Are Presented *In Vivo* by HLA-B27**—The peptides corresponding to ion peaks 1346.3 from HPLC fraction number 134 and 1493.8 from fraction number 162 were sequenced by

**FIG. 4. Sequencing of the chlamydial B\*2705 ligands P-(112–121) and P-(112–122) from P-(90–450) transfectant cells.** A, MS/MS spectrum of the  $[M + 3H]^{3+}$  ion peak at  $m/z$  449.6 in HPLC fraction number 134 from the B\*2705-bound peptide pool of P-(90–450) transfectant cells. This peptide corresponds to the  $M + H^+$  ion peak at  $m/z$  1346.3 in Fig. 2B. The MS/MS spectrum is compared with that of the  $[M + 3H]^{3+}$  ion peak of the synthetic peptide RRINRE-AERF, corresponding to residues 112–121 of the chlamydial DNA primase (lower panel). The fragment ion at  $m/z$  522.30 (upper panel) or 522.23 (lower panel) is compatible with  $y_4$  and  $[b_8 + H_2O]^{+2}$  and was not assigned. B, MS/MS spectrum of the  $[M + 3H]^{3+}$  ion peak at  $m/z$  498.6 in HPLC fraction number 162 from the B\*2705-bound peptide pool of P-(90–450) transfectant cells. This peptide corresponds to the  $M + H^+$  ion peak at  $m/z$  1493.8 in Fig. 2C. The MS/MS spectrum is compared with that of the  $[M + 3H]^{3+}$  ion peak of the synthetic peptide RRINREAEFF, corresponding to residues 112–122 of the chlamydial DNA primase (lower panel). The fragment ion at  $m/z$  669.51 (upper panel) or 669.41 (lower panel) is compatible with both  $y_5$  and  $y_{10}^{+2}$ . However, the latter ion was assigned on the basis of the concomitant presence of the  $[y_{10} - NH_3]^{+2}$  ion at  $m/z$  660.96 and 660.86, respectively. The ions at  $m/z$  574.44 and 591.79 (upper panel) or 574.45 and 591.57 (lower panel) could correspond to  $[b_9 - 2NH_3]^{+2}$  or  $[y_9 - 2NH_3]^{+2}$  and  $b_9^{+2}$  or  $y_9^{+2}$ , respectively, and were not assigned.



quadrupole ion trap nano-ESI MS/MS, and their assigned sequences were confirmed with the MS/MS spectra of the corresponding synthetic peptides (Fig. 4). The two peptides corresponded to residues 112–121 and 112–122 of the chlamydial DNA primase. A search against the human genome failed to reveal identity of these peptides with human proteins, further supporting their bacterial origin.

Because a putative peptide with the bacterial sequence spanning residues 112–120 would also have the appropriate

size and motifs for HLA-B27 binding, we looked for this peptide in the B\*2705-bound pool from the P-(90–450) transfectant using the strategy described in the previous paragraph. We first determined that the retention time of the corresponding synthetic peptide in the same chromatographic conditions used for fractionation of the peptide pool corresponded to fraction number 104. Then we looked for an ion peak with the corresponding  $m/z$  ( $M + H^+$ , 1199.7) in the MALDI-TOF MS spectra of HPLC fractions 102–106 of the P-(90–450) trans-

fectant and subjected to MS/MS fragmentation the same chromatographic fractions in the  $m/z$  range corresponding to the  $[M + 2H]^{2+}$  and  $[M + 3H]^{3+}$  parent ions. This was done to account for the possibility that the peptide would not show up in the MALDI-TOF MS spectra but might still be detectable by electrospray MS. Using this approach the P-(112–120) was not found in the B\*2705-bound pool.

**Proteasome-mediated Processing of the P-(90–450) Fusion Protein**—To determine whether the chlamydial B\*2705 ligands were generated in a proteasome-dependent way the B\*2705-C1R transfectants expressing P-(90–450) were metabolically labeled with  $[^{15}\text{N}_2]\text{Arg}$  in the absence and presence of the proteasome inhibitor MG132. This approach was used previously to determine the proteasome dependence of B\*2705 ligands (29). Because the isotopically labeled Arg contains two  $^{15}\text{N}$  atoms, its incorporation results in an increase of 2 Da per Arg residue in the molecular mass of any given Arg-containing peptide. Because cell viability is severely compromised upon long exposure to proteasome inhibitors the labeling time was only of 5 h so that the intracellular pool of unlabeled peptides was not depleted. In these conditions in the MALDI-TOF MS spectrum a labeled peptide will be similar to the unlabeled one except for a selective increase of the corresponding isotopic species. Of the three chlamydial peptides only the most abundant one, P-(112–121), was amenable to this analysis (Fig. 5) due to the low amounts of the other ligands, which precluded their reliable analysis with this method. Upon labeling, a significant increase in the intensity of the  $M + 8$  ion peak (where  $M$  is the monoisotopic peak) was observed, corresponding to the presence of 4 Arg residues in the P-(112–121) peptide. This increased intensity was totally abolished in the presence of MG132, indicating that this ligand is generated from P-(90–450) in a proteasome-dependent way.

**P-(112–121) and P-(112–122) Show High Sequence Homology with Human Proteins**—To address the possible existence of self-HLA-B27 ligands showing molecular mimicry with these chlamydial peptides, we looked for homologous human protein sequences containing the binding motifs of HLA-B27. P-(112–121) and P-(112–122) were searched against the human proteome to look for sequences containing >50% amino acid identity with the respective bacterial sequence and the major binding motif for HLA-B27, R2. As many as 50 sequences filled these initial criteria. This does not reflect any particular feature of B27-binding peptides because a similar search carried out with sequences of the same size from the DNA primase lacking the B27 binding motif yielded a comparable number of matches with the human proteome (data not shown). In a second step sequences containing residues at a given position that have not been observed among natural HLA-B27 ligands (32) were selected out. The following filters were applied: 1) presence of an acidic residue at position (P)1 and 2) presence of an acidic or polar C-terminal residue. After applying these filters, 33 human sequences remained. A fur-

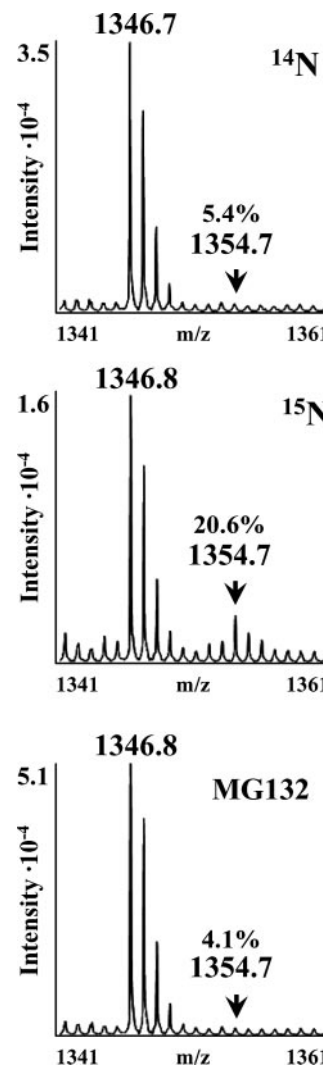


FIG. 5. MALDI-TOF MS spectra of the chlamydial peptide P-(112–121), RRINREAERF, from the B\*2705-bound peptide pool of unlabeled P-(90–450) transfectant cells ( $^{14}\text{N}$ ),  $[^{15}\text{N}]\text{Arg}$ -labeled cells in the absence of proteasome inhibitor ( $^{15}\text{N}$ ), and labeled cells in the presence of  $20\ \mu\text{M}$  MG132. The expanded MS spectrum of the peptide from unlabeled cells shows the normal distribution of isotopic species. Upon labeling with  $^{15}\text{N}$ -tagged Arg, containing two  $^{15}\text{N}$  atoms, the MS spectrum is altered by a selective increase of the corresponding isotopic species,  $M + 8$  where  $M$  is the monoisotopic peak. In the presence of MG132 this alteration is not observed. The percent intensity of the  $M + 8$  peak relative to the corresponding monoisotopic peak in each situation is indicated.

ther selection focused on the subset of sequences containing optimal binding motifs at the anchor positions P1, P3, and PΩ. The optimal residues were considered to be those with the highest frequency at the corresponding position among natural B\*2705 ligands (32): Gly or a basic residue at P1, an aliphatic/aromatic residue (except Ala) at P3, and a basic, aliphatic (except Ala) or aromatic residue at PΩ. A total of 16 human sequences fulfilled these criteria (Table I). These results indicate that the human proteome contains multiple



TABLE I

Human protein sequences with optimal features for HLA-B27 binding and &gt;50% amino acid identity with P-(112–121) or P-(112–122)

Sequence <sup>a</sup>	Identity <sup>b</sup>	Protein	Accession no.
	%		
GRLKREAEYF	60	POZ domain-containing protein KCTD16	Q68DU8
RRIAQEVQRF	60	Negative elongation factor C/D	Q8IXH7
RRIDREEKAF	60	Cadherin-10 precursor	Q9Y6N8
RRIDREEKAFY	55	Cadherin-10 precursor	Q9Y6N8
RRIGKEQELF	60	Threonyl-tRNA synthetase, mitochondrial precursor	Q9BW92
RRIGKEQELFF	64	Threonyl-tRNA synthetase, mitochondrial precursor	Q9BW92
RRIGNSLEKFF	55	Sperm 1 POU domain transcription factor	Q8N7G0
RRINRQLEAL	60	Cyclin G1-binding protein 1	O43257
RRINDEIERQL	64	Guanine nucleotide-binding protein, q polypeptide	Q6NT27
RRITRENDRDR	55	Hypothetical protein DKFZp547E087	Q8ND77
RLDLIEAERL	60	Hypothetical protein DKFZp667M2010	Q8NCY6
RRLRGKEAKRF	60 <sup>c</sup>	cDNA FLJ41781 fis, clone IMR322018117	Q6ZW18
RRLRGKEAKRFF	58 <sup>c</sup>	cDNA FLJ41781 fis, clone IMR322018117	Q6ZW18
RRLSREQERL	60	Serine/threonine-protein kinase MRCK $\gamma$	Q6DT37
RRMFKEADDF	55	DCP1 protein	Q15540
RRYGRDATTR	60	Docking protein 4	Q8TEW6

<sup>a</sup> Residues identical with the bacterial peptide are underlined.<sup>b</sup> Relative to the bacterial peptide of equal length.<sup>c</sup> This sequence was aligned allowing for the introduction of a gap in the bacterial peptide.<sup>d</sup> POZ, pox virus and zinc finger; KCTD, potassium channel tetramerization domain; POU, bipartite DNA binding domain derived from the transcriptions factors pituitary-specific Pit-1, octamer-binding proteins, and the neural *Unc-86* transcription factor of *C. elegans*; MRCK, myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase; DCP, dipeptidyl carboxydipeptidase.

protein sequences with the optimal HLA-B27 binding motifs and >50% sequence identity with two natural HLA-B27 ligands from *C. trachomatis*.

## DISCUSSION

A specific aim of this study was to examine the possibility of molecular mimicry between HLA-B27 ligands from the DNA primase of *C. trachomatis* and from human self-proteins. The basis for this search was a previous finding from our laboratory that a peptide spanning residues 309–320 of the cytoplasmic tail of HLA-B27 and other class I molecules (RRKSSGGKGGSY) was a natural ligand of three HLA-B27 subtypes associated to ankylosing spondylitis and that this peptide had a high homology with residues 211–222 of the chlamydial DNA primase (RRFKEGGRRGGKY). The bacterial peptide encompassing these residues bound HLA-B27 *in vitro* and was directly generated by the 20 S proteasome from a synthetic precursor (11). Moreover because the persistent forms of *Chlamydia*, which maintain the chronic infection and are present in the inflammation sites of patients with ReA induced by this bacteria, are active in DNA replication (3), the DNA primase should be actively induced in these forms and therefore a potential source of bacterial antigen in chronic disease. Although it is unclear how and what chlamydial proteins may reach the processing-loading pathway of MHC class I molecules and to what extent they may be processed in the cytosol or other cell compartments, we specifically addressed the question of whether intracellular processing of the endogenously synthesized DNA primase might lead to generation of the P-(211–222) peptide and/or other HLA-B27 ligands with

homology to human protein sequences. This approach was also undertaken because a direct mapping of HLA-B27-restricted chlamydial epitopes from infected cells by MS techniques is exceedingly difficult due to very low expression of bacterial epitopes on infected cells (19, 20) and to down-regulation of MHC class I expression induced by *C. trachomatis* on infected cells (6, 7).

Two problems hampered our initial attempts to directly express the chlamydial DNA primase in human cells. First direct transfection of the bacterial gene resulted in active transcription but no evidence for significant translation of the protein. Presumably this was due to low compatibility of the bacterial RNA sequences with the eukaryotic translation machinery. To circumvent this problem and to easily monitor protein expression, a fusion protein was constructed by placing the GFP gene at the 5'-end of the DNA primase gene. The second problem was that this construction led to expression of the fusion protein in transient transfectants of human cells, indicating efficient translation,<sup>2</sup> but stable transfectants could not be obtained. We speculated that expression of the bacterial protein might interfere with human DNA replication by competing for DNA binding with the human primase or by other blocking effects. Thus, alternative fusion proteins were made in which either the DNA binding domain or both this and the helicase interaction domain of the bacterial DNA primase were deleted because the P-(211–222) sequence was located in the central topoisomerase-primase domain of the molecule.

<sup>2</sup> J. J. Cragolini and J. A. López de Castro, unpublished observations.

Both of these constructs could be expressed in stable transfectants of B\*2705-C1R cells and were therefore useful for further biochemical analyses. Because the shorter construct was expressed at higher levels, this was used for the subsequent molecular characterization of chlamydial HLA-B27 ligands.

The main findings of our study are the following. First the P-(211–222) peptide, which is homologous to an MHC class I-derived HLA-B27 ligand, is not produced by endogenous processing of the bacterial DNA primase in C1R cells at least at the levels detected by the MS techniques used in this study. Instead the closely related P-(211–221) peptide was endogenously processed and presented by B\*2705. Using synthetic peptides to assess the sensitivity of our MS protocols, we estimated that our detection level in MALDI-TOF MS for HLA-B27 ligands is around 150 molecules/cell equivalent (data not shown). We cannot rule out that smaller amounts of one or more of the P-(211–222) or other related peptides, such as P-(211–218) or P-(211–223), might be produced and presented by HLA-B27 in very low amounts. The endogenous presentation of P-(211–221) is consistent with the possibility that this sequence of the DNA primase might be a mediator of molecular mimicry between *Chlamydia* and the homologous HLA-B27 self-ligand and be relevant in HLA-B27-associated disease. This result validates the experimental approach used in this study as it demonstrates that a peptide from the endogenously produced bacterial protein can be efficiently processed, presented by HLA-B27, and detected by MS analysis of the HLA-B27-bound peptide pool.

The endogenous processing and presentation of P-(211–221), but not other related peptides, has two noteworthy aspects. First, *in vitro* digestions of the synthetic precursor P-(203–230) by purified 20 S proteasome revealed cleavage after Tyr-222 and, more efficiently, after Ile-223, but no cleavage after Lys-221. Thus, in contrast to other reported examples (33, 34) the proteasomal digestion pattern *in vitro* did not reflect the endogenous processing of the corresponding protein. Second, P-(211–221) is unlikely to be presented by other ankylosing spondylitis-associated subtypes such as B\*2702, B\*2704, and B\*2707 because its C-terminal Lys residue is not a suitable anchor for these subtypes (32, 35). However, the possibility that related peptides with suitable anchors, particularly P-(211–223), which contains an aliphatic C-terminal residue, might be presented by these subtypes cannot be ruled out.

The second finding of our study was that two additional and closely related peptides of the chlamydial DNA primase are efficiently presented by HLA-B27 following endogenous processing. To our knowledge, P-(112–121) and P-(112–122) are, together with P-(211–221), the first peptides from *C. trachomatis* shown to be natural HLA-B27 ligands produced by endogenous processing of the bacterial proteins. Further studies specifically focused on presentation of these peptides on *Chlamydia*-infected cells and on looking for HLA-B27-

restricted CTLs from ReA patients capable of recognizing these peptides will now be feasible.

The relatively high yield of P-(112–121) allowed us to establish the proteasome dependence of this peptide using stable isotope tagging and proteasome inhibition and to confirm that the P-(90–450) fusion protein is degraded through the proteasome pathway. The other chlamydial ligands were not amenable to this analysis due to their low yield. However, in a previous report in which this same approach was used to examine the proteasome dependence of B\*2705 ligands, multiple peptides arising from the same parental protein consistently showed the same pattern of either sensitivity or insensitivity to proteasome inhibitors (29).

Of note, the P-(112–120) peptide, RRINREAER, was not found in the HLA-B27-bound pool, although the sequence of this peptide includes all the major HLA-B27 binding motifs. Indeed we are not aware of any natural HLA-B27 ligand with concomitant basic P $\Omega$  and acidic P $\Omega$  – 1 residues, whereas the latter residues are relatively frequent among HLA-B27 ligands with C-terminal aliphatic/aromatic motifs (32). A possible explanation might be that the presence of Glu immediately before the C-terminal Arg residue might impair cleavage after Arg-120 by the tryptic-like activity of the proteasome. Adjacent acidic residues are well known to impair tryptic cleavage of the peptide bonds involving basic residues. The trypsin-like active site of the proteasome is different from that of trypsin in that the hydrolytic activity of both proteases is mediated by Thr and Ser, respectively. However, as in trypsin, acidic residues in the  $\beta$ 2 and  $\beta$ 2i subunits of the proteasome are presumably involved in directing the trypsin-like cleavage specificity toward basic residues (36). However, arguing against this explanation, multiple natural ligands with an acidic residue preceding a C-terminal basic residue have been reported for several HLA-A allotypes (37–39). Therefore, it is possible that absence of this motif among HLA-B27 ligands might be due to binding-related, rather than antigen processing, restrictions.

A limitation of the MALDI-TOF-based comparison of HLA-B27-bound peptide pools is that if a chlamydial peptide has the same molecular mass and retention time as an endogenous self-ligand it would not show up as a differential ion peak and might go undetected. For this reason, we cannot rule out the possibility that additional bacterial peptides, other than those specifically searched for with synthetic peptides and discussed above, might be presented by HLA-B27 in our experimental system and have gone unnoticed in our peptide pool comparisons.

That multiple human sequences showed high homology with P-(112–121) and P-(112–122) suggests that one or more self-ligands of HLA-B27 showing molecular mimicry with these bacterial peptides may actually exist. This issue can be directly addressed by specifically looking for the corresponding peptides in the constitutive HLA-B27-bound pool. The homology between P-(112–121) and P-(112–122) with human

sequences does not reflect any particular tendency of these or other B27-binding peptides to mimic human proteins because unrelated sequences from the bacterial DNA primase of the same length but lacking the B27 binding features showed comparable matching with the human proteome (data not shown).

In conclusion, the approach used in this study is a valid one to determine chlamydial peptides that are processed *in vivo* and presented by HLA-B27 in human cells. In its application to mapping HLA-B27-restricted epitopes of the DNA primase, it allowed us to identify three bacterial ligands, including one with high homology to a natural self-ligand of HLA-B27 previously suggested as a potential pathogenetic candidate in *Chlamydia*-induced ReA (11) and two peptides with high homology to human sequences containing HLA-B27 binding motifs, some of which might be potentially cross-reactive self-antigens. The experimental approach and results of this study now open the way to attempt a direct identification of these and other bacterial peptides from the HLA-B27-bound peptide pool of infected cells by directly searching such peptides on the basis of their molecular mass, chromatographic features, and MS fragmentation pattern. In addition, the transfectants generated in this study can be used as target cells for CTLs from patients with *Chlamydia*-induced ReA to test the putative pathogenetic relevance of the identified bacterial peptides. Both types of studies are of major importance to elucidate the role of *C. trachomatis* and HLA-B27 in the pathogenesis of this disease but hardly feasible at the present time in the absence of candidate peptide epitopes.

**Acknowledgments**—We thank our colleagues M. Marcilla (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO)), M. Ramos (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain), and M. Torres and C. Clavería (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain) for help and advice. We also thank Anabel Marina and Juan P. Albar (Proteomics Department, CBMSO and Centro Nacional de Biotecnología, respectively) and their technical staff for assistance in MS.

\* This work was supported by Ministry of Science and Technology Grant SAF2005-03188 and an institutional grant of the Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ The on-line version of this article (available at <http://www.mcponline.org>) contains supplemental material.

‡ To whom correspondence should be addressed: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, c/ Nicolás Cabrera N. 1, Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain. Tel.: 34-91-196-4554; Fax: 34-91-196-4420; E-mail: [aldecastro@cbm.uam.es](mailto:aldecastro@cbm.uam.es).

#### REFERENCES

- Zeidler, H., Kuipers, J., and Kohler, L. (2004) Chlamydia-induced arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **16**, 380–392.
- Brunham, R. C., and Rey-Ladino, J. (2005) Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 149–161.
- Gerard, H. C., Krause-Opatz, B., Wang, Z., Rudy, D., Rao, J. P., Zeidler, H., Schumacher, H. R., Whittum-Hudson, J. A., Kohler, L., and Hudson, A. P. (2001) Expression of Chlamydia trachomatis genes encoding products required for DNA synthesis and cell division during active versus persistent infection. *Mol. Microbiol.* **41**, 731–741.
- Belland, R. J., Nelson, D. E., Virok, D., Crane, D. D., Hogan, D., Sturdevant, D., Beatty, W. L., and Caldwell, H. D. (2003) Transcriptome analysis of chlamydial growth during IFN- $\gamma$ -mediated persistence and reactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15971–15976.
- Zhong, G., Fan, T., and Liu, L. (1999) Chlamydia inhibits interferon  $\gamma$ -inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J. Exp. Med.* **189**, 1931–1938.
- Zhong, G., Liu, L., Fan, T., Fan, P., and Ji, H. (2000) Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon  $\gamma$ -inducible major histocompatibility complex class I expression in chlamydia-infected cells. *J. Exp. Med.* **191**, 1525–1534.
- Zhong, G., Fan, P., Ji, H., Dong, F., and Huang, Y. (2001) Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J. Exp. Med.* **193**, 935–942.
- Loomis, W. P., and Starnbach, M. N. (2002) T cell responses to Chlamydia trachomatis. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 87–91.
- Kuon, W., Holzhtuter, H. G., Appel, H., Grolms, M., Kollnberger, S., Traeder, A., Henklein, P., Weiss, E., Thiel, A., Lauster, R., Bowness, P., Radbruch, A., Klotzel, P. M., and Sieper, J. (2001) Identification of HLA-B27-restricted peptides from the *Chlamydia trachomatis* proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J. Immunol.* **167**, 4738–4746.
- Appel, H., Kuon, W., Kuhne, M., Wu, P., Kuhlmann, S., Kollnberger, S., Thiel, A., Bowness, P., and Sieper, J. (2004) Use of HLA-B27 tetramers to identify low-frequency antigen-specific T cells in Chlamydia-triggered reactive arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **6**, R521–R534.
- Ramos, M., Alvarez, I., Sesma, L., Logean, A., Rognan, D., and Lopez de Castro, J. A. (2002) Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 37573–37581.
- Bachmaier, K., and Penninger, J. M. (2005) Chlamydia and antigenic mimicry. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **296**, 153–163.
- Popov, I., Dela Cruz, C. S., Barber, B. H., Chiu, B., and Inman, R. D. (2001) The effect of an anti-HLA-B27 immune response on CTL recognition of Chlamydia. *J. Immunol.* **167**, 3375–3382.
- Popov, I., Dela Cruz, C. S., Barber, B. H., Chiu, B., and Inman, R. D. (2002) Breakdown of CTL tolerance to self HLA-B\*2705 induced by exposure to Chlamydia trachomatis. *J. Immunol.* **169**, 4033–4038.
- Evavold, B. D., Sloan-Lancaster, J., Wilson, K. J., Rothbard, J. B., and Allen, P. M. (1995) Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity* **2**, 655–663.
- Wucherpfennig, K. W., and Strominger, J. L. (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695–705.
- Fourneau, J. M., Bach, J. M., Van Endert, P. M., and Bach, J. F. (2004) The elusive case for a role of mimicry in autoimmune diseases. *Mol. Immunol.* **40**, 1095–1102.
- Bachmaier, K., Neu, N., de la Maza, L. M., Pal, S., Hessel, A., and Penninger, J. M. (1999) Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* **283**, 1335–1339.
- Ramos, M., Alvarez, I., Garcia-del-Portillo, F., and Lopez de Castro, J. A. (2001) Minimal alterations in the HLA-B27-bound peptide repertoire induced upon infection of lymphoid cells with Salmonella typhimurium. *Arthritis Rheum.* **44**, 1677–1688.
- Ringrose, J. H., Meiring, H. D., Speijer, D., Feltkamp, T. E., van Els, C. A., de Jong, A. P., and Dankert, J. (2004) Major histocompatibility complex class I peptide presentation after Salmonella enterica serovar typhimurium infection assessed via stable isotope tagging of the B27-presented peptide repertoire. *Infect. Immun.* **72**, 5097–5105.
- Storkus, W. J., Howell, D. N., Salter, R. D., Dawson, J. R., and Cresswell, P. (1987) NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J. Immunol.* **138**, 1657–1659.
- Zemmour, J., Little, A. M., Schendel, D. J., and Parham, P. (1992) The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J. Immunol.* **148**, 1941–1948.

23. Long, E. O., Rosen-Bronson, S., Karp, D. R., Malnati, M., Sekaly, R. P., and Jaraquemada, D. (1991) Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and lymphoid cells. *Hum. Immunol.* **31**, 229–235
24. Calvo, V., Rojo, S., Lopez, D., Galocha, B., and Lopez de Castro, J. A. (1990) Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism. *J. Immunol.* **144**, 4038–4045
25. Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F., and Ziegler, A. (1978) Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetic analysis. *Cell* **14**, 9–20
26. Paradelo, A., Garcia-Peydro, M., Vazquez, J., Rognan, D., and Lopez de Castro, J. A. (1998) The same natural ligand is involved in allorecognition of multiple HLA-B27 subtypes by a single T cell clone: role of peptide and the MHC molecule in alloreactivity. *J. Immunol.* **161**, 5481–5490
27. Paradelo, A., Alvarez, I., Garcia-Peydro, M., Sesma, L., Ramos, M., Vazquez, J., and Lopez de Castro, J. A. (2000) Limited diversity of peptides related to an alloreactive T cell epitope in the HLA-B27-bound peptide repertoire results from restrictions at multiple steps along the processing-loading pathway. *J. Immunol.* **164**, 329–337
28. Merino, E., Montserrat, V., Paradelo, A., and Lopez de Castro, J. A. (2005) Two HLA-B14 subtypes (B\*1402 and B\*1403) differentially associated with ankylosing spondylitis differ substantially in peptide specificity, but have limited peptide and T-cell epitope sharing with HLA-B27. *J. Biol. Chem.* **280**, 35868–35880
29. Marcilla, M., Cragnolini, J. J., and Lopez de Castro, J. A. (2007) Proteasome-independent HLA-B27 ligands arise mainly from small basic proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 923–938
30. Ramos, M., Paradelo, A., Vazquez, M., Marina, A., Vazquez, J., and Lopez de Castro, J. A. (2002) Differential association of HLA-B\*2705 and B\*2709 to ankylosing spondylitis correlates with limited peptide subsets but not with altered cell surface stability. *J. Biol. Chem.* **277**, 28749–28756
31. Sesma, L., Montserrat, V., Lamas, J. R., Marina, A., Vazquez, J., and Lopez de Castro, J. A. (2002) The peptide repertoires of HLA-B27 subtypes differentially associated to spondyloarthropathy (B\*2704 and B\*2706) differ by specific changes at three anchor positions. *J. Biol. Chem.* **277**, 16744–16749
32. Lopez de Castro, J. A., Alvarez, I., Marcilla, M., Paradelo, A., Ramos, M., Sesma, L., and Vazquez, M. (2004) HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens* **63**, 424–445
33. Kessler, J. H., Beekman, N. J., Bres-Vloemans, S. A., Verdijk, P., van Veelen, P. A., Kloosterman-Joosten, A. M., Vissers, D. C., ten Bosch, G. J., Kester, M. G., Sijts, A., Drijfhout, J. W., Ossendorp, F., Offringa, R., and Melief, C. J. (2001) Efficient identification of novel HLA-A\*0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J. Exp. Med.* **193**, 73–88
34. Alvarez, I., Sesma, L., Marcilla, M., Ramos, M., Martí, M., Camafeita, E., and Lopez de Castro, J. A. (2001) Identification of novel HLA-B27 ligands derived from polymorphic regions of its own or other class I molecules based on direct generation by 20 S proteasome. *J. Biol. Chem.* **276**, 32729–32737
35. Gomez, P., Montserrat, V., Marcilla, M., Paradelo, A., and López de Castro, J. A. (2006) B\*2707 differs in peptide specificity from B\*2705 and B\*2704 as much as from HLA-B27 subtypes not associated to spondyloarthritis. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1867–1881
36. Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., and Tsukihara, T. (2002) The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure (Lond.)* **10**, 609–618
37. Seeger, F. H., Schirle, M., Gatfield, J., Arnold, D., Keilholz, W., Nickolaus, P., Rammensee, H. G., and Stevanovic, S. (1999) The HLA-A\*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis. *Immunogenetics* **49**, 571–576
38. Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M., Obermayr, F., Walter, S., Schor, O., Kurek, R., Loeser, W., Bichler, K. H., Wernet, D., Stevanovic, S., and Rammensee, H. G. (2002) Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* **62**, 5818–5827
39. Kruger, T., Schor, O., Lemmel, C., Kraemer, B., Reichle, C., Dengjel, J., Weinschenk, T., Muller, M., Hennenlotter, J., Stenzl, A., Rammensee, H. G., and Stevanovic, S. (2005) Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **54**, 826–836
40. Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E. L., Studholme, D. J., Yeats, C., and Eddy, S. R. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **32**, D138–D141





**Title:**

**Endogenous Processing and Presentation of T-cell Epitopes from *Chlamydia trachomatis* with Relevance in HLA-B27-associated Reactive Arthritis**

**Authors:**

Juan J. Cragnolini, Noel García-Medel and José A. López de Castro

**Affiliation:**

Centro de Biología Molecular *Severo Ochoa* (Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid), Universidad Autónoma, 28049 Madrid, SPAIN.

*Address correspondence to:* Dr. José A. López de Castro. Centro de Biología Molecular *Severo Ochoa*, c/ Nicolás Cabrera N. 1, Universidad Autónoma, 28049 Madrid, SPAIN.  
Phone: 34-91-196 4554; Fax: 34-91-196 4420. Email: [aldecastro@cbm.uam.es](mailto:aldecastro@cbm.uam.es)

**Running title:**

Chlamydial HLA-B27 epitopes

**Abstract**

*Chlamydia trachomatis* triggers reactive arthritis, a spondyloarthropathy linked to the human Major Histocompatibility Complex molecule HLA-B27, through an unknown mechanism that might involve molecular mimicry between chlamydial and self-derived HLA-B27 ligands. *Chlamydia*-specific HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocytes are commonly found in reactive arthritis patients, but the immunogenic epitopes are unknown. A previous screening of the chlamydial genome for putative HLA-B27 ligands predicted multiple peptides that were recognized *in vitro* by cytotoxic T lymphocytes from patients. Here stable transfectants expressing bacterial fusion proteins in human cells were generated to investigate the endogenous processing and presentation by HLA-B27 of two such epitopes, through comparative immunoproteomics of HLA-B27-bound peptide repertoires. A predicted T-cell epitope, from the CT610 gene product, was endogenously presented by HLA-B27. This is, to our knowledge, the first endogenously processed epitope involved in HLA-B27-restricted responses against *C. trachomatis* and involved in reactive arthritis. A second predicted epitope, from the CT634 gene product, was not detected. Instead, a non-predicted nonamer from the same protein was identified. Both bacterial peptides showed very high homology with human sequences containing the HLA-B27-binding motif. Thus, expression and intracellular processing of chlamydial proteins into human cells allowed us to identify two bacterial HLA-B27 ligands, including the first endogenous T-cell epitope from *C. trachomatis* involved in spondyloarthropathy. That human proteins contain sequences mimicking chlamydial T-cell epitopes provides a sound basis for an autoimmune component of *Chlamydia*-induced HLA-B27-associated disease.

**Abbreviations:**

ReA: reactive arthritis

MHC: Major Histocompatibility Complex

CTL: cytotoxic T lymphocyte

MS: mass spectrometry

GFP: green fluorescence protein

NQRA: (Na<sup>+</sup>)-translocating NADH-quinone reductase subunit A

PqqC: pyrroloquinoline-quinone synthase-like protein

mAb: monoclonal antibody

TFA: trifluoroacetic acid

HPLC: high performance liquid chromatography

htMDM: high throughput Mass Data Manager

## Introduction

*Chlamydia trachomatis* is an obligate intracellular parasite that infects the urogenital epithelium. It is a very common infectious agent and the most frequent pathogen inducing reactive arthritis (ReA) in Western countries (1). Multiple strategies, including down-regulation of Major Histocompatibility Complex (MHC) class I and class II expression (2-4) and persistence, are developed by the bacteria to evade the immune system. Yet, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses are activated upon infection (5). In particular, HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) are found in patients with *Chlamydia*-induced ReA (6,7). The role of these T-cells in the pathogenesis and evolution of ReA to chronic disease is probably mediated by IFN- $\gamma$ . Secretion of this cytokine is a critical aspect of the protective immunity of CTL against *Chlamydia* (8), since it inhibits the bacterial growth (9). However, this effect is often insufficient to promote complete clearance of *C. trachomatis*, and actually IFN- $\gamma$ -induced depletion of the tryptophan pool induces the differentiation of the metabolically active reticular bodies to persistent forms of the bacteria (10), which are critical to sustain chronic infection and ReA. The high prevalence of HLA-B27 among patients with *Chlamydia*-induced reactive arthritis (11), especially in its chronic form, suggests a mechanism based on interactive effects of the bacteria and HLA-B27 in the pathogenesis of this disease, which seems to be unrelated to the capacity of *C. trachomatis* to infect or replicate into HLA-B27-positive cells (12). One such mechanism could be T-cell-mediated autoimmunity elicited by molecular/antigenic mimicry between chlamydial and self-derived HLA-B27 ligands. Antigenic mimicry between chlamydial and homologous  $\alpha$ -myosin-derived peptides is crucial to inducing autoimmune myocarditis in mice (13). Breakdown of CTL tolerance to self-HLA-B27 has been observed in transgenic rats upon exposure to *C. trachomatis* (14). To our knowledge, cross-

reactivity between HLA-B27-restricted *Chlamydia*-specific CTL with self-derived HLA-B27 epitopes has not been reported so far. However, a biochemical basis for such cross-reactivity was established from the finding of an endogenously processed and presented peptide derived from the DNA primase of *C. trachomatis* with very high homology to a self-derived HLA-B27 ligand (15,16).

Due to the likely involvement of HLA-B27 in the pathogenesis of chronically evolving ReA, the role of CTL responses in the protective immunity against *C. trachomatis* and the presence of HLA-B27-restricted CTL in patients with *Chlamydia*-induced ReA, the elucidation of the relevant chlamydial epitopes becomes crucial to establish the pathogenetic mechanism of this disease. Unfortunately, a direct molecular identification of chlamydial HLA-B27 ligands expressed on infected cells is an exceedingly difficult task, due to their extremely low amounts, which challenge even the most sensitive techniques of mass spectrometry (MS) available to date. In the case of *Chlamydia*, the situation is further complicated by the down-regulation of MHC class I expression shortly after infection (3,4). To our knowledge, only one MHC class I ligand has been directly identified, in the mouse system, from *C. muridarum*-infected cells, using state-of-the-art MS techniques in a recent study (17). Due in part to this difficulty, alternative approaches, such as expression cloning and synthetic peptide epitope mapping (18,19) or MHC class I tetramer arrays (20), have been used to identify MHC class I-restricted chlamydial CTL epitopes in the mouse system. In a previous study (6) predictive algorithms were used to screen the whole genome of *C. trachomatis* for nonamer peptide sequences containing the HLA-B\*2705 binding motif and a high probability of being generated by proteasomal cleavage. This led to the identification of multiple sequences that, when used as synthetic peptides in target sensitization assays, were recognized by CTL from patients with *Chlamydia*-induced

ReA. Such CTL could also be detected in the synovial fluid of these patients using HLA-B27 tetramers complexed to some of these peptide epitopes (7).

Where all these strategies identify chlamydial sequences that are recognized by CTL, they do not prove that these peptides are the endogenously processed epitopes that activated the natural CTL responses to the bacteria *in vivo*. Due to the intrinsic cross-reactive potential of T cells (21,22), it is conceivable that synthetic chlamydial peptides recognized *in vitro* by activated CTL may be different from the natural T-cell epitopes generated by endogenous processing of the chlamydial proteins that elicit the HLA-B27-restricted CTL responses in ReA patients. To investigate this issue we focused on two predicted T-cell epitopes from *C. trachomatis* (6). Stable transfectants expressing the corresponding parental proteins fused to green fluorescence protein (GFP) were generated in a B\*2705-positive lymphoid cell line. The endogenous processing and presentation of the predicted epitopes, or other peptides from the same bacterial protein, was analyzed by comparative immunoproteomic analysis of the B\*2705-bound peptide repertoires from transfected and untransfected cells, and sequencing of peptides differentially presented on the bacterial protein transfectant.

## Experimental Procedures

**Bacterial gene constructs and transfectants.** GFP-bacterial fusion proteins were produced fusing the cDNA coding for the (Na<sup>+</sup>)-translocating NADH-quinone reductase subunit A (NQRA) or pyrroloquinoline-quinone synthase-like protein (PqqC) (CT634 and CT610 gene products, respectively) of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 (Advanced Biotechnologies, Columbia, MD) to the 3'end of the GFP gene. Both chlamydial proteins, of 465 and 231 amino acid residues, respectively, were amplified by PCR using the following primers:

5'TCTCTCTCGAATTCTATGAAAATAGTTGTTTCTCGCGGA and  
 3'TCTCTCTCGGATCCTAACGAGGAGGTACCACATT for NQRA, and  
 5'CTCTCTCTAGATCTATGATGGAGGTGTTTATGAATTTT and  
 3'CTCTCTCTGTGCGACATAAGATTGATGACAACTACAACA, for PqqC. Each of the complete sequences was cloned into the pGFP-C1 vector (BD Biosciences Clontech), in the EcoRI and BamHI sites, and in the BglII and Sall sites, respectively. Stable GFP, GFP-NQRA and GFP-PqqC transfectants were generated and characterized as previously described (16). Briefly, the human HLA-A, B deficient lymphoid cell line C1R (23) was electroporated with the GFP-chlamydial protein constructs and the RSV5 vector, carrying the hygromycin resistance gene. Fluorescent hygromycin-resistant cells were selected by flow cytometry, and the expression of the corresponding fusion protein was analyzed by Western blot, either directly from cell lysates (PqqC) or after immunoprecipitation with anti-GFP antibody (NQRA).

**Isolation of HLA-B27-bound peptides.** B2705-bound peptides were isolated from 1-2x10<sup>10</sup> C1R-B\*2705 cells and C1R-B\*2705 transfectants cells expressing chlamydial proteins as previously described (24). Briefly, cells were lysed in 1% Igepal CA-630 (Sigma), 20mM Tris/HCl buffer, 150mM NaCl, pH 7.5, in the presence of a cocktail of

protease inhibitors. After ultracentrifugation, HLA-B27-peptide complexes were isolated by affinity chromatography of the soluble fraction with the W6/32 monoclonal antibody (mAb) (IgG2a, specific for a monomorphic HLA-A, B and C determinant) (25). HLA-B27-bound peptides were eluted at room temperature with 0.1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA), and concentrated by filtration through Centricon 3 devices (Amicon, Beberly, MA). The HLA-B27-bound peptide pools were fractionated by high performance liquid chromatography (HPLC) using a Waters Alliance system (Waters, Milford, MA), as previously described (26), using a Vydac 218TP52-C18 column (Vydac, Hesperia, CA) at a flow rate of 100  $\mu$ l/min. Fractions of 50  $\mu$ l were collected and stored at -20°C.

**Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS analysis.** HPLC fractions were analyzed in a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA). HPLC fractions were dried down with a SpeedVac system (Savant Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN), reconstituted in 0.6  $\mu$ l of TA buffer (33% aqueous acetonitrile, 0.1% TFA), loaded onto an Opti-TOF<sup>TM</sup> 384-well MALDI insert (Applied Biosystems), and allowed to dry at room temperature. Then, 0.6  $\mu$ l of matrix solution ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (Bruker Daltoniks, Bremen, Germany) at 3 mg/ml was added and allowed to dry at room temperature. MS data were acquired in reflector positive mode and analyzed using the Data Explorer software version 4.9 (Applied Biosystems).

**Automated comparative analysis of MALDI-TOF MS data.** A systematic comparison of the MALDI-TOF MS spectra of the HPLC fractions from HLA-B27-bound peptide pools was carried out with an algorithm programmed in Visual Basic 6.0 and implemented as a macro within Microsoft© Excell. It was designated as high throughput Mass Data Manager (htMDM). The htMDM tool recognizes the raw



numeric data list from each individual mass spectrum from the MALDI-TOF/TOF mass spectrometer software and it uses the following parameters:  $m/z$ , relative intensity, and signal to noise ratio (s/n). For automatic comparison of MS spectra from distinct peptide pools, the following adjustments were made. First, the  $m/z$  signals smaller than a minimal user-defined s/n, relative to the average s/n of the MS spectrum, were removed. In our study this value was set as 3-fold. Second, due to s/n heterogeneity within any given MS spectrum, the s/n of each ion peak, relative to the maximal s/n observed in the MS spectrum was calculated, and values below a user-defined relative s/n were filtered out. In our study this cut-off value was set at 5%. Third, for comparison of MS spectra corresponding to correlative ( $\pm 1$ ) HPLC fractions from two peptide pools, ion peaks were considered to reflect identical peptides when their observed  $m/z$  were within a user-defined range, which depends on the accuracy of the instrument used. In our study this range was set at  $\pm 0.4$ . Prior to the comparisons, an exclusion list of matrix-related ion peaks was generated from direct MS analysis of the matrix without any peptide sample. The ion peaks whose  $m/z$  values were identical ( $\pm 0.4$ ) to those in this list were automatically excluded from all the MS spectra to be compared.

In addition, the htMDM tool allows to automatically search for ion peaks with specific  $m/z$  values, such as candidate peptide epitopes or peptides of a particular size. A user-defined inclusion list with the  $m/z$  values of interest can be stored and used to automatically screen all the MS spectra for the presence of ion peaks with identical ( $\pm 0.4$ )  $m/z$  for their quick identification. The htMDM output consists of a listing of filtered  $m/z$  values with the corresponding retention time or HPLC fraction number. Matches with the exclusion and inclusion directories are marked, as well as shared and specific  $m/z$  signals from each of the peptide repertoires compared.

To verify the performance of the htMDM tool, both automatic and manual comparisons of the HLA-B27-bound peptide repertoires in the present study were carried out.

**Peptide sequencing.** MALDI-TOF-TOF MS/MS fragmentation spectra were acquired at 1Kv, using collision-induced dissociation, atmospheric air as collision gas, and a precursor mass window of  $\pm 2.5$  Da. Interpretation of the MS/MS spectra was done manually, but assisted by various software tools as follows. Manual inspection of the spectrum usually allowed us to derive a tentative sequence. This was used to screen the chlamydial protein sequences NQRA and PqqC (UniProtKB/Swiss-Prot accession N. O84639 and O84616, respectively) for a possible match using the Mascot software (version 2.2) at

[http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=SQ](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=SQ)

(Matrix Science Inc, Boston, USA). The MS-product software tool (version 5.1.8) at <http://prospector.ucsf.edu> (University of California, San Francisco, USA), which generates a list of theoretical fragment ions from a candidate peptide sequence, was then used as an assistance to match the putative candidate sequences from the chlamydial proteins to our experimental MS/MS spectra. The assigned sequences were formally confirmed by comparing the experimental MS/MS spectra with those of the corresponding synthetic peptides.

**Homology searches.** The search for sequence homology between Chlamydial peptides and human proteins was carried out in the non-redundant protein database, using the Blastp software, at <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (National Center for Biotechnology, Bethesda, MD). The most recent versions available of the database Release 33, January 22, 2009) and search algorithm were used.

## Results

**Identification of endogenously processed HLA-B27-restricted T-cell epitopes from *Chlamydia trachomatis* in human cells.** The following strategy was originally developed in a previous study from our laboratory (16) and was here adapted to investigate the endogenous processing and presentation of HLA-B27 ligands from *C. trachomatis* that, when added exogenously as synthetic peptides, were recognized by HLA-B27-restricted CTL from ReA patients in target sensitization assays (6). The experimental setup consists of the following steps (Figure 1): 1) B\*2705-C1R cells were used as recipients to generate stable transfectants expressing bacterial fusion proteins, 2) to achieve efficient expression of chlamydial proteins in human cells, fusion constructs were generated in which the GFP coding sequence was placed at the 5'-end of the corresponding chlamydial gene, 3) B\*2705-bound peptide repertoires were isolated from large amounts of B\*2705-C1R cells expressing or not the bacterial protein, 4) both peptide pools were fractionated by HPLC in consecutive runs and identical conditions, to minimize alterations in the peptide elution patterns, 5) the MALDI-TOF MS spectrum of every HPLC fraction from each peptide pool was obtained, and compared with the correlative (i), previous (i-1) and following (i+1) fractions of the other pool, to look for peptides found only in the peptide pool from the bacterial transfectant, 6) the amino acid sequence of the differential peptide species were determined from the corresponding MALDI-TOF-TOF MS/MS fragmentation spectra, 7) the assigned sequence was validated by comparison of the MS/MS spectrum with that of the corresponding synthetic peptide. If this analysis failed to reveal the presence of the predicted T-cell epitope, a blind MS/MS fragmentation analysis was carried out in the HPLC fraction corresponding to the expected retention time of the

peptide epitope, as well as in neighbor fractions, using a narrow gate corresponding to the mass-to-charge ratio ( $m/z$ ) of the peptide.

**Expression of chlamydial fusion proteins in B\*2705- C1R cells.** In the present study we focused on the CT634 and CT610 genes, coding for the NQRA and PqqC proteins, respectively (27). Both proteins contain sequences recognized *in vitro*, as exogenously added synthetic peptides, by *Chlamydia*-specific, HLA-B27-restricted, CTL from ReA patients (6). In addition, PqqC stimulated the secretion of IFN- $\gamma$  by peripheral blood mononuclear cells from *Chlamydia*-infected patients with urogenital infection (28). NQRA is a polypeptide of 465 residues involved in Na<sup>+</sup> transport from the cytoplasm to the periplasm. PqqC is a polypeptide of 231 residues that is expressed in the native state as a homodimer. This protein is secreted into the host cytoplasm and is a *Chlamydia*-specific toxin that induces apoptosis in mammalian cell lines (29,30). Both proteins are natural components of elementary bodies, as determined by proteomic analysis (31).

Gene constructs in which the GFP gene was placed at the 5'-end of the chlamydial gene (Figure 2A) were separately transfected into B\*2705-C1R cells. The stable expression of the bacterial fusion proteins in transfectant cells was established by flow cytometry (Figure 2B) and confirmed by detection of a band of the expected size upon Western blot analysis with anti-GFP antibody (Figure 2C).

**A single HLA-B27 chlamydial ligand differentially detected in NQRA transfectants is unrelated to the predicted T-cell epitope.** HLA-B27-bound peptide pools were isolated from B\*2705-C1R cells, B\*2705-C1R transfected with GFP alone and B\*2705-C1R cells expressing the NQRA fusion protein. The pools were fractionated by HPLC, and the MALDI-TOF MS spectra of the individual HPLC fractions from cells expressing or not the bacterial protein were systematically compared as described in the Methods section. A total of 4895 ion peaks from the NQRA transfectant were compared

with 4958 and 4526 ion peaks from untransfected B\*2705-C1R cells and GFP transfectants, respectively. Only one ion peak from the NQRA transfectant, with mass-to-charge ratio ( $m/z$ ) 1054.7 in HPLC fr. 208, was absent from B\*2705-C1R cells (Figure 3A), and from the transfectant expressing GFP alone (not shown). The amino acid sequence of this peptide was determined by MALDI-TOF/TOF MS/MS, and assigned as a nonamer, KRALLEIVI, spanning residues 86-94 of the Chlamydial NQRA protein. The assignment was confirmed by comparison of the MS/MS spectrum with that of the corresponding synthetic peptide (Figure 3B). The NQRA(86-94) peptide was unrelated to the T-cell epitope from this protein, spanning residues 330-338: MRDHTITLL, which was predicted on the basis of theoretical algorithms and recognized by CTL *in vitro* (6). In contrast, the endogenously processed peptide was not among those predicted in that report.

The possibility that low amounts of NQRA(330-338) might have escaped detection in the global comparison of the B\*2705-bound peptide pools was addressed by determining the elution position of the synthetic peptide in the same chromatographic conditions used for fractionation of the HLA-B27-bound peptide pools, and looking for the corresponding ion peak in the MALDI-TOF MS spectra of that and neighbor ( $\pm 6$ ) HPLC fractions from the bacterial transfectant. No evidence for an ion peak consistent with NQRA(330-338) was found within the detection limits of the MALD-TOF/TOF instrument used (data not shown). Of note, this peptide was very inefficient in inducing HLA-B27 refolding *in vitro* (7), suggesting that it is a low-affinity ligand.

**The predicted T-cell epitope from the chlamydial PqqC protein is endogenously processed and presented by HLA-B27.** The same strategy was used for determining the endogenous processing of HLA-B27 ligands from PqqC. Upon systematic

comparison of the MALDI-TOF MS spectra from the HPLC-fractionated HLA-B27-bound peptide pools, involving 4905 ion peaks from the PqqC transfectant, 2 ion peaks, not found in the corresponding HPLC fractions from B\*2705-C1R cells (Figure 4A and 5A) or B\*2705-C1R cells expressing GFP alone (data not shown), were detected. One of these peaks, with  $m/z$  1055.7 in HPLC fr. 184 from the PqqC transfectant (Figure 4A), had the same molecular mass and chromatographic retention time as the predicted T-cell epitope from this protein, spanning residues 70-78: ARKLLLDNL (6). The amino acid sequence of the differentially expressed B\*2705 ligand, was determined by MALDI-TOF/TOF MS/MS and its assignment as the chlamydial T-cell epitope was formally confirmed by comparison of the MS/MS spectrum with that of the corresponding synthetic peptide (Figure 4B).

The second differential ion peak, with  $m/z$  1183.5, was found in HPLC fr. 182 from the PqqC transfectant (Figure 5A). The amino acid sequence of this peptide was determined by MALDI-TOF/TOF MS/MS and assigned as TRFSYAEYF (Figure 5B). This sequence was unrelated to the chlamydial PqqC protein, but matched exactly the N-terminal region of the human ankyrin repeat and SOCS box protein 2 (ASB2, accession N.: Q96Q27). This is a likely substrate recognition component of E3 ubiquitin-protein ligase complexes (32).

**NQRA(86-94) and PqqC(70-78) are highly homologous to human protein sequences with the HLA-B27 binding motif.** The chlamydial B\*2705 ligand NQRA(86-94), KRALLEIVI, was screened for homologous sequences against the human proteome database. This search identified a highly homologous human sequence (Table 1) from the DnaJ homolog DJB14 (accession N. Q8TBM8). The following features confer special significance to this homology. First, the human counterpart contains the binding motif of HLA-B27, including R2, a nonpolar C-

terminal residue (M9), and a small N-terminal residue (A1) that is frequent among B\*2705 ligands (33). Second, 6 of 9 consecutive residues in the human homologue (66.7%) are identical to the chlamydial peptide. These residues include R2, the secondary anchor residue A3, and virtually the whole central region, which is usually exposed and recognized by the T-cell antigen receptor (TCR) in MHC class I ligands (34). Third, this stretch of identical residues is followed by two conservative differences, at peptide positions 8 and 9, involving aliphatic residues: VI and IM in the chlamydial peptide and human homolog, respectively.

An analogous search for homologies with the human proteome was carried out for the chlamydial PqqC(70-78) epitope, ARKLLLDNL. Again, this peptide showed a very high homology with residues 172-180 of the nuclear export receptor exportin 6 (accession N. Q96QU8). This sequence, LRKLLLDQV, also shows 6 of 9 identical residues (66.7%), including the main R2 motif of HLA-B27 ligands, the secondary anchor residue K3, and identity in the whole central region (residues 4-7: LLLD) of the peptide. In addition, the two sequences show chemically similar aliphatic residues at the anchor positions 1 (A and L, respectively) and 9 (L and V, respectively) and polar ones at the accessible position 8 (N and Q respectively).

These results indicate that 2 endogenously processed HLA-B27 ligands from *C. trachomatis* are highly homologous to human sequences containing the HLA-B27 binding motif and many features that might favor TCR cross-recognition.

## Discussion

The recognition of HLA-B27-restricted chlamydial antigens by CTL is potentially important in the pathogenesis of spondyloarthropathies at least for two reasons. First, because it may favor the establishment of bacterial persistence, a crucial event in chronic infection, through the production of IFN- $\gamma$  (10). Second, because it might induce autoimmune cross-reactivity and tissue injury through molecular mimicry with self-derived HLA-B27 ligands constitutively expressed in the target tissues (13,35,36). Thus, the report of a series of chlamydial HLA-B27 ligands, selected from the screening of the bacterial genome with predictive algorithms, that were recognized by CTL from patients with *Chlamydia*-induced ReA (6,7) was a significant step towards defining the nature of the CTL responses in this disease. However, this approach has several inherent limitations. The most important one is that, due to the intrinsic cross-reactive nature of CTL (21,22), a synthetic peptide recognized by an activated CTL *in vitro*, could be unrelated to the natural peptide epitope that stimulated the activation of that CTL *in vivo*. Moreover, predictive algorithms used to search for chlamydial T-cell epitopes are based on parameters that may not be highly accurate due, for instance, to insufficient refinement of MHC class I binding motifs (37) or to lack of correspondence between proteasomal cleavage *in vivo* and the specificity of the 20S proteasome *in vitro* (38). Finally, the screening of the chlamydial genome with these predictive algorithms was limited, for practical reasons, to nonameric sequences, although a significant percentage of HLA-B27 ligands are longer than nonamers (33). Thus, the relevance of the predicted CTL epitopes both in the immune response against *C. trachomatis* and in ReA must be validated by demonstrating their endogenous processing and presentation *in vivo* by HLA-B27, which was investigated in the present study.



Our approach involved the endogenous expression of bacterial proteins in stable transfectant cells, and the direct identification of endogenously processed bacterial ligands from such proteins by MS. Although this approach was shown to allow the identification of naturally processed chlamydial ligands from the transfected protein (16), several methodological issues deserve consideration. First, is this a sound alternative to the direct identification of chlamydial epitopes from infected cells?. Second, are the proteins analyzed likely to reach the MHC class I antigen processing pathway under conditions of natural infection?. Third, is an MS-based approach sensitive enough to detect natural T-cell epitopes, which might be expressed in very low amounts and still recognized by CTL? (39,40). The two first questions can only be addressed by considering the mechanism and significance of the antigen cross-presentation pathways (41). Chlamydial proteins should reach the MHC class I antigen presentation pathway of the professional antigen presenting cells, namely dendritic cells, after uptake of antigen-loaded apoptotic bodies. Bacterial proteins in the endosomal compartment of dendritic cells can be transferred to the cytosol by an incompletely characterized mechanism, which probably implies at least the sec61 traslocon (42) and perhaps other pathway(s) (43). The bacterial proteins would then be incorporated to the proteasome pathway. In principle, any bacterial protein might be processed in this way, although many unknown factors in the endosome-to-cytosol transfer mechanism may impose unforeseen limitations on the chlamydial proteins amenable to proteasomal degradation. Those reaching this pathway would be presumably processed by a similar mechanism as endogenous proteins, as in our study. However, other possible cross-presentation pathways that bypass protein entry into de cytosol and proteasomal degradation may also play a role, such as endoplasmic reticulum-phagosome fusion, or antigen processing in the endocytic compartment, followed by peptide interchange by

the MHC class I molecule upon endosomal recycling between this compartment and the cell surface. Putative chlamydial antigens loaded into HLA-B27 in these ways would not be amenable to analysis by our approach. However, the actual contribution of these pathways to cross-presentation remains ill-defined (41). Thus, it seems to be no sound reason supporting that the generation of HLA-B27 epitopes upon processing of endogenously synthesized chlamydial proteins, as analyzed in this study, may be different than antigen processing through the cytosolic pathway, as it occurs on antigen-presenting cells upon natural infection. In *Chlamydia*-infected host cells the most obvious candidates to reach the cytosolic pathway for MHC class I-mediated antigen presentation are the proteins secreted into the cytoplasm (44), or others having direct access to it, such as those in the vacuolar membrane (18,19). However it is conceivable that other proteins, or protein fragments, from *Chlamydia* may reach the cytosol through cross-presentation mechanisms that remain largely undefined in non-professional antigen presenting cells.

Another question relates to the sensitivity of the MS techniques used in our study to detect bacterial ligands, relative to the extreme sensitivity of activated CTL. We have grossly estimated that, in our experimental conditions, the detection limit for HLA-B27 ligands would be around 100-200 copies per cell. This figure might be one to two orders of magnitude below the sensitivity of CTL, which might recognize only a few epitope copies per cell (39,40). Yet, it is reasonable to assume that antigen presentation from an endogenously synthesized protein upon transfection will yield much more peptide copies presented by HLA-B27 than on infected cells, since much more protein amount will reach the cytosolic degradation pathway. Thus, it is likely that our experimental system allows biochemical detection of peptides that might be presented upon natural infection in extremely low amounts. For this reason, a candidate

chlamydial peptide not found in the B27-bound peptide pool in our experimental system is unlikely to be presented as a T-cell epitope on infected cells. Yet, this possibility cannot be formally ruled out solely by biochemical criteria.

With the above considerations in mind, our results demonstrate both the reach and the limitations of the epitope prediction algorithms used for screening the chlamydial genome (6). Whereas they can actually reveal some naturally processed peptides, as was the case for PqqC(70-78), they may fail to predict others, such as NQRA(86-94) in this study, or predict some epitopes that are apparently not processed *in vivo*, such as NQRA(330-338). Thus, predictive algorithms for putative T-cell epitopes can only be considered as a first step to orient an experimental search for naturally processed antigens. Any putative T-cell epitope, even if recognized *in vitro* by CTL, should be confirmed by experiments involving endogenous processing and presentation of the candidate antigen, either by direct biochemical analysis, as done in this study, or by CTL recognition of the transfectant cells expressing the parental chlamydial protein, or both.

To our knowledge, PqqC(70-78) is the first HLA-B27-restricted antigen from *Chlamydia trachomatis* recognized by CTL from ReA patients that has been shown to be endogenously processed and presented *in vivo*.

It is noteworthy that the two chlamydial peptides naturally processed and presented by HLA-B27 have closely related sequences in the human proteome. These homologous human sequences share with the chlamydial peptides not only a very high percentage of amino acid identity, but, even more important, identical or chemically similar main anchor residues and identical central regions of the peptide, which are those mainly recognized by the TCR. We have previously shown that a peptide derived from the chlamydial DNA primase with high homology to a natural self-derived ligand

of HLA-B27 is endogenously processed and presented by this molecule, providing a sound basis for molecular mimicry between chlamydial and self-derived HLA-B27 ligands (16). Here, in two further examples, we show that the human proteome includes sequences with the potential to generate HLA-B27 ligands with very high homology to endogenously processed HLA-B27 ligands of *C. trachomatis*, including a proven HLA-B27-restricted T-cell epitope. This level of homology between short bacterial peptides and human proteins may be relatively frequent and not restricted to these particular examples (45). However, they show that there are multiple possibilities for the generation of self-derived HLA-B27 ligands with obvious mimicry to naturally processed chlamydial epitopes. Whether these homologous sequences are actually processed and generate natural HLA-B27 ligands was not addressed in this study, and deserves further analysis. Obviously, a biochemical approach to molecular mimicry such as that used in this study is necessarily restricted to structurally homologous peptides. In addition, T-cell cross-reactivity may occur between peptides with no detectable similarity (21,22), which cannot be analyzed in this way.

The finding of a self-derived HLA HLA-B27 ligand differentially expressed in the PqqC transfectant cells indicates that, in our experimental system, differential ion peaks may not necessarily correspond to bacterial peptides, and that determining their amino acid sequence is essential for proper assignment. We do not know the reason for the differential expression of a self-derived peptide in the chlamydial protein transfectant. There are three possibilities. First, the peptide could be a shared ligand that was detected by chance only in the PqqC transfectant, but not in the other cells analyzed. Second, the parental ASB2 protein of this self-derived ligand was upregulated by chance in the particular PqqC transfectant used in our study. Third, up-regulation of the ASB2 protein might have occurred as a specific consequence of the expression of the

GFP-PqqC fusion protein. We consider the first possibility unlikely because the differential ion peak was observed in the same transfectant, but not in any of the others, in two distinct experiments involving independently obtained peptide pools. We cannot rule out the second possibility, as it would require repeating this analysis in a second, independently obtained PqqC transfectant, which was not attempted. The third possibility would be consistent with the speculation that GFP-PqqC expression might up-regulate certain components of the ubiquitin/proteasome pathway of protein degradation, to which ASB2 belongs. Since this issue is unrelated to the main point of this study, that is, processing and presentation of chlamydial ligands, it was not further pursued.

In conclusion, expression of chlamydial proteins in HLA-B27-positive human cells is a reliable and sensitive method to identify endogenously processed bacterial ligands presented by HLA-B27 *in vivo*. Using this approach we demonstrated, for the first time to our knowledge, the endogenous processing and presentation of an HLA-B27-restricted T-cell epitope recognized by CTL from ReA patients, but failed to confirm the endogenous generation of a second T-cell epitope identified by predictive algorithms and *in vitro* CTL recognition assays. In contrast, we identified an unrelated nonamer from the same parental protein that was endogenously processed and presented by HLA-B27 but was not identified by the predictive strategy, which reveals the limitations of predictive methods for identifying natural MHC class I ligands and T-cell epitopes. The very close similarity of the two natural HLA-B27 ligands from *C. trachomatis* identified in this study with amino acid sequences containing the HLA-B27 binding motif in the human proteome provides a sound basis for molecular mimicry between chlamydial and self-derived HLA-B27 ligands. This would be consistent with

an autoimmune mechanism of ReA in which cross-reactivity of *Chlamydia*-specific HLA-B27-restricted CTL with self-derived HLA-B27 ligands may play a crucial role.

**Acknowledgements.**

This work was supported by grants SAF2005/03188 and SAF2008/00461 from the Ministry of Science and Innovation and an institutional grant of the Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular *Severo Ochoa*. We thank the staff of the Proteomics facilities at the Centro Nacional de Biotecnología, Madrid (member of the ProteoRed network) for help in mass spectrometry.

## Reference List

1. Zeidler, H., Kuipers, J., and Kohler, L. (2004) Chlamydia-induced arthritis. *Curr.Opin.Rheumatol.* **16**, 380-392.
2. Zhong, G., Fan, T., and Liu, L. (1999) Chlamydia inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J.Exp.Med.* **189**, 1931-1938.
3. Zhong, G., Liu, L., Fan, T., Fan, P., and Ji, H. (2000) Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in chlamydia-infected cells. *J.Exp.Med.* **191**, 1525-1534.
4. Zhong, G., Fan, P., Ji, H., Dong, F., and Huang, Y. (2001) Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. *J.Exp.Med.* **193**, 935-942.
5. Loomis, W. P. and Starnbach, M. N. (2002) T cell responses to Chlamydia trachomatis. *Curr.Opin.Microbiol.* **5**, 87-91.
6. Kuon, W., Holzhutter, H. G., Appel, H., Grolms, M., Kollnberger, S., Traeder, A., Henklein, P., Weiss, E., Thiel, A., Lauster, R., Bowness, P., Radbruch, A., Kloetzel, P. M., and Sieper, J. (2001) Identification of HLA-B27-restricted peptides from the *Chlamydia trachomatis* proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J.Immunol.* **167**, 4738-4746.
7. Appel, H., Kuon, W., Kuhne, M., Wu, P., Kuhlmann, S., Kollnberger, S., Thiel, A., Bowness, P., and Sieper, J. (2004) Use of HLA-B27 tetramers to identify low-



frequency antigen-specific T cells in Chlamydia-triggered reactive arthritis.

*Arthritis Res.Ther.* **6**, R521-R534.

8. Lampe, M. F., Wilson, C. B., Bevan, M. J., and Starnbach, M. N. (1998) Gamma interferon production by cytotoxic T lymphocytes is required for resolution of Chlamydia trachomatis infection. *Infect.Immun.* **66**, 5457-5461.
9. Shemer, Y. and Sarov, I. (1985) Inhibition of growth of Chlamydia trachomatis by human gamma interferon. *Infect.Immun.* **48**, 592-596.
10. Brunham, R. C. and Rey-Ladino, J. (2005) Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine. *Nat.Rev.Immunol.* **5**, 149-161.
11. Keat, A. C., Maini, R. N., Nkwazi, G. C., Pegrum, G. D., Ridgway, G. L., and Scott, J. T. (1978) Role of Chlamydia trachomatis and HLA-B27 in sexually acquired reactive arthritis. *Br.Med.J.* **1**, 605-607.
12. Young, J. L., Smith, L., Matyszak, M. K., and Gaston, J. S. (2001) HLA-B27 expression does not modulate intracellular Chlamydia trachomatis infection of cell lines. *Infect.Immun.* **69**, 6670-6675.
13. Bachmaier, K., Neu, N., de la Maza, L. M., Pal, S., Hessel, A., and Penninger, J. M. (1999) Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* **283**, 1335-1339.
14. Popov, I., Dela Cruz, C. S., Barber, B. H., Chiu, B., and Inman, R. D. (2002) Breakdown of CTL tolerance to self HLA-B\*2705 induced by exposure to Chlamydia trachomatis. *J.Immunol.* **169**, 4033-4038.

15. Ramos, M., Alvarez, I., Sesma, L., Logean, A., Rognan, D., and Lopez de Castro, J. A. (2002) Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J.Biol.Chem.* **277**, 37573-37581.
16. Cragolini, J. J. and Lopez de Castro, J. A. (2008) Identification of endogenously presented peptides from *Chlamydia trachomatis* with high homology to human proteins and to a natural self-ligand of HLA-B27. *Mol.Cell Proteomics* **7**, 170-180.
17. Karunakaran, K. P., Rey-Ladino, J., Stoyanov, N., Berg, K., Shen, C., Jiang, X., Gabel, B. R., Yu, H., Foster, L. J., and Brunham, R. C. (2008) Immunoproteomic discovery of novel T cell antigens from the obligate intracellular pathogen *Chlamydia*. *J.Immunol.* **180**, 2459-2465.
18. Fling, S. P., Sutherland, R. A., Steele, L. N., Hess, B., D'Orazio, S. E., Maisonneuve, J., Lampe, M. F., Probst, P., and Starnbach, M. N. (2001) CD8+ T cells recognize an inclusion membrane-associated protein from the vacuolar pathogen *Chlamydia trachomatis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 1160-1165.
19. Starnbach, M. N., Loomis, W. P., Ovendale, P., Regan, D., Hess, B., Alderson, M. R., and Fling, S. P. (2003) An inclusion membrane protein from *Chlamydia trachomatis* enters the MHC class I pathway and stimulates a CD8+ T cell response. *J.Immunol.* **171**, 4742-4749.
20. Grotenbreg, G. M., Roan, N. R., Guillen, E., Meijers, R., Wang, J. H., Bell, G. W., Starnbach, M. N., and Ploegh, H. L. (2008) Discovery of CD8+ T cell epitopes in *Chlamydia trachomatis* infection through use of caged class I MHC tetramers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 3831-3836.

21. Wucherpfennig, K. W. and Strominger, J. L. (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695-705.
22. Evavold, B. D., Sloan-Lancaster, J., Wilson, K. J., Rothbard, J. B., and Allen, P. M. (1995) Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity* **2**, 655-663.
23. Zemmour, J., Little, A. M., Schendel, D. J., and Parham, P. (1992) The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J.Immunol.* **148**, 1941-1948.
24. Paradela, A., Garcia-Peydro, M., Vazquez, J., Rognan, D., and Lopez de Castro, J. A. (1998) The same natural ligand is involved in allorecognition of multiple HLA-B27 subtypes by a single T cell clone: role of peptide and the MHC molecule in alloreactivity. *J.Immunol.* **161**, 5481-5490.
25. Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F., and Ziegler, A. (1978) Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetic analysis. *Cell* **14**, 9-20.
26. Paradela, A., Alvarez, I., Garcia-Peydro, M., Sesma, L., Ramos, M., Vazquez, J., and Lopez de Castro, J. A. (2000) Limited diversity of peptides related to an alloreactive T cell epitope in the HLA-B27-bound peptide repertoire results from restrictions at multiple steps along the processing-loading pathway. *J.Immunol.* **164**, 329-337.

27. Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R. L., Zhao, Q., Koonin, E. V., and Davis, R. W. (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* **282**, 754-759.
28. Olsen, A. W., Follmann, F., Hojrup, P., Leah, R., Sand, C., Andersen, P., and Theisen, M. (2007) Identification of human T cell targets recognized during *Chlamydia trachomatis* genital infection. *J.Infect.Dis.* **196**, 1546-1552.
29. Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Zapata, J. M., Pawlowski, K., Godzik, A., and Reed, J. C. (2002) CADD, a *Chlamydia* protein that interacts with death receptors. *J.Biol.Chem.* **277**, 9633-9636.
30. Schwarzenbacher, R., Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Robinson, H., Yuan, H., Bossy-Wetzel, E., Reed, J. C., and Liddington, R. C. (2004) Structure of the *Chlamydia* protein CADD reveals a redox enzyme that modulates host cell apoptosis. *J.Biol.Chem.* **279**, 29320-29324.
31. Skipp, P., Robinson, J., O'Connor, C. D., and Clarke, I. N. (2005) Shotgun proteomic analysis of *Chlamydia trachomatis*  
1. *Proteomics* **5**, 1558-1573.
32. Heuze, M. L., Guibal, F. C., Banks, C. A., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Cayre, Y. E., Benecke, A., and Lutz, P. G. (2005) ASB2 is an Elongin BC-interacting protein that can assemble with Cullin 5 and Rbx1 to reconstitute an E3 ubiquitin ligase complex. *J.Biol.Chem.* **280**, 5468-5474.

33. Lopez de Castro, J. A., Alvarez, I., Marcilla, M., Paradela, A., Ramos, M., Sesma, L., and Vazquez, M. (2004) HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens* **63**, 424-445.
34. Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996) Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* **384**, 134-141.
35. Benjamin, R. and Parham, P. (1990) Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol.Today* **11**, 137-142.
36. Bachmaier, K. and Penninger, J. M. (2005) Chlamydia and antigenic mimicry. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **296**, 153-163.
37. Ruppert, J., Sidney, J., Celis, E., Kubo, R. T., Grey, H. M., and Sette, A. (1993) Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA- A2.1 molecules. *Cell* **74**, 929-937.
38. Rock, K. L. and Goldberg, A. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu.Rev.Immunol.* **17**, 739-779.
39. Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T. J., and Eisen, H. N. (1996) Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity* **4**, 565-571.
40. Purbhoo, M. A., Irvine, D. J., Huppa, J. B., and Davis, M. M. (2004) T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat.Immunol.* **5**, 524-530.

41. Lin, M. L., Zhan, Y., Villadangos, J. A., and Lew, A. M. (2008) The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol.Cell Biol.* **86**, 353-362.
42. Ackerman, A. L., Giodini, A., and Cresswell, P. (2006) A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity.* **25**, 607-617.
43. Rock, K. L. (2006) Exiting the outside world for cross-presentation. *Immunity.* **25**, 523-525.
44. Kleba, B. and Stephens, R. S. (2008) Chlamydial effector proteins localized to the host cell cytoplasmic compartment. *Infect.Immun.* **76**, 4842-4850.
45. Davies, J. M. (2000) Introduction: Epitope mimicry as a component cause of autoimmune disease. *Cell Mol.Life Sci.* **57**, 523-526.

## Figure legends

**Figure 1.** Summary of the strategy used to identify endogenously processed HLA-B27 ligands from *Chlamydia trachomatis*. The B\*2705-bound peptide repertoires were isolated, in parallel experiments, from about  $1-2 \times 10^{10}$  C1R transfectant cells expressing (2) or not (1) a GFP-bacterial fusion protein, by immunopurification of HLA-B27 and acid extraction (3). The peptide pools were fractionated by HPLC under identical conditions and in consecutive runs (4). Each individual HPLC fraction was analyzed by MALDI-TOF MS and the corresponding MS spectra of correlative fractions were systematically compared to identify peptides found only in the bacterial protein transfectant (5). The amino acid sequence of the differentially expressed peptides was determined by MS/MS fragmentation analysis (6). The corresponding peptide was chemically synthesized and the MS/MS spectrum of the synthetic peptide was compared with that of the endogenous ligand (7).

**Figure 2.** Expression of chlamydial fusion proteins in B\*2705-C1R cells. (A) Schematic structure of the GFP-NQRA and GFP-PqqC fusion proteins; (B) Flow cytometry analysis showing the GFP-associated fluorescence of the NQRA (left panel) and PqqC (right panel) fusion protein transfectants. Untransfected B\*2705-C1R cells (white histogram) or cells transfected with GFP alone (black histogram) were included as controls; (C) Western blot analysis showing the expression of the NQRA (left) and PqqC (right) fusion proteins in the respective transfectant cells. The immunoblot was done on the material immunoprecipitated with anti-GFP antibody (NQRA) or on whole lysates (PqqC). In the former case, the prominent non-specific band corresponds to the heavy chain of the anti-GFP antibody used for immunoprecipitation. In both cases the fusion protein and GFP are noted with upper and lower arrows, respectively.

**Figure 3.** A single endogenous HLA-B27 ligand identified from the chlamydial NQRA protein is unrelated to the predicted T-cell epitope. (A) MALDI-TOF MS spectra of fr. 208 from the HLA-B27-bound peptide pools isolated from the NQRA transfectant (above) and untransfected B\*2705-C1R cells (below), showing a single ion peak, at  $m/z$  1054.7, differentially present in the bacterial transfectant. Only the relevant sections of the spectra are shown. This ion peak was also not detected in the adjacent fractions, N. 207 and N. 209, of the untransfected cells (not shown). (B) MALDI-TOF/TOF MS/MS spectra of the ion peak at  $m/z$  1054.7 from the bacterial NQRA transfectant, showing the assigned sequence (above) and of the corresponding synthetic peptide (below). The assignment of the ion peak with  $m/z$  129.1 as b1 is ambiguous, since it is also consistent with a K immonium ion.

**Figure 4.** A single endogenous HLA-B27 ligand identified from the chlamydial PqqC protein shows identity with the predicted T-cell epitope. (A) MALDI-TOF MS spectra of fr.184 from the HLA-B27-bound peptide pools isolated from the PqqC transfectant (above) and untransfected B\*2705-C1R cells (below), showing a single detected ion peak, at  $m/z$  1055.7, differentially present in the bacterial transfectant. Only the relevant sections of the spectra are shown. This ion peak was also not detected in the adjacent fractions, N. 183 and N. 185, of the untransfected cells (not shown). The ion peak at  $m/z$  1053.6, labeled with an asterisk, was a shared ligand found in the adjacent fr. 185 from B\*2705-C1R. (B) MALDI-TOF/TOF MS/MS spectra of the ion peak at  $m/z$  1055.7 from the bacterial PqqC transfectant, showing the assigned sequence (above) and of the corresponding synthetic peptide (below). The background of periodically spaced ion peaks in the upper MS/MS spectrum are related to each other by 44  $m/z$  units, with a related series differing by 16  $m/z$  units. They arise from traces of the Igepal CA-630 detergent, octylphenyl-polyethylene glycol:  $(C_2H_4O)_n C_{14}H_{22}O$ , used for cell lysis.

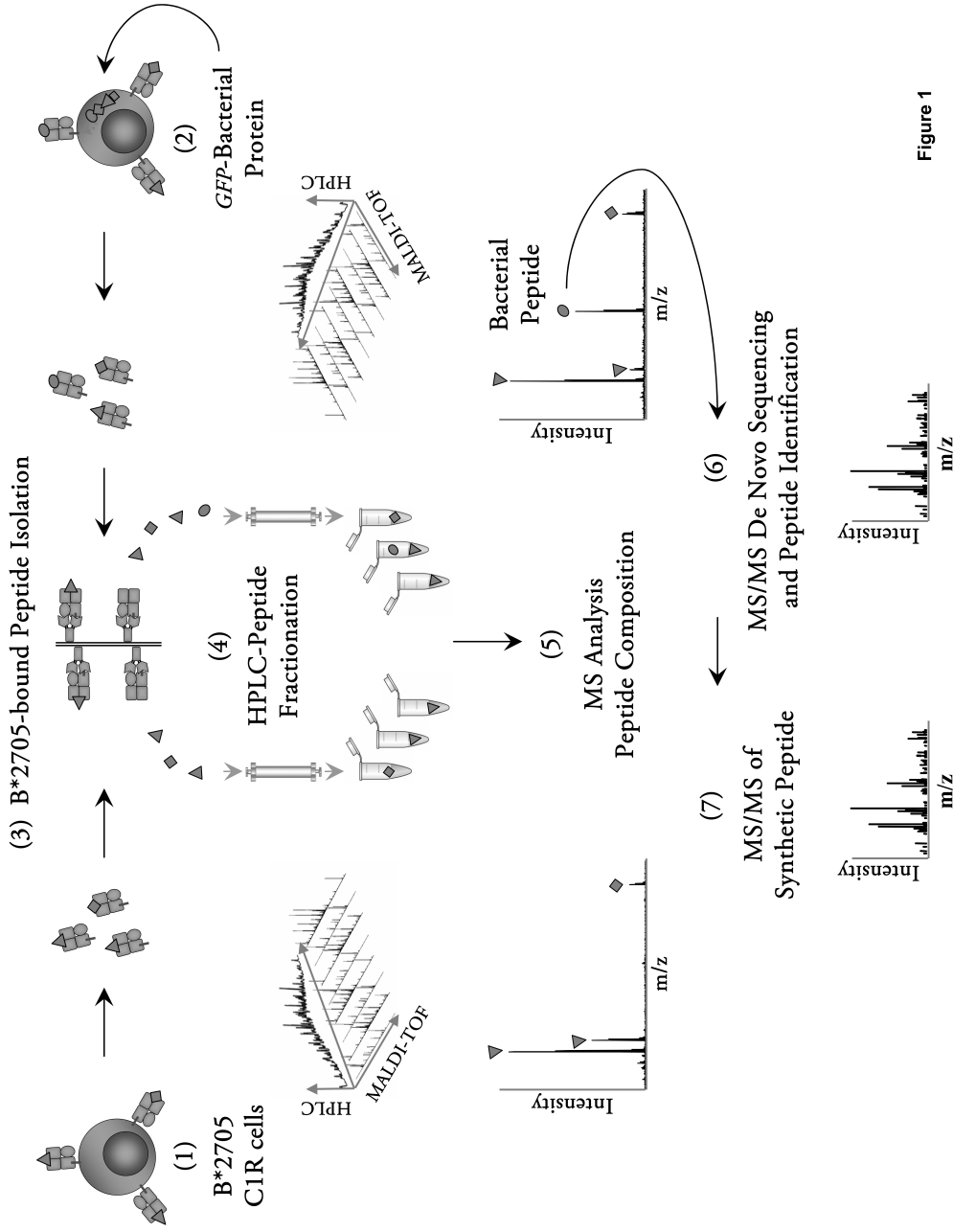


**Figure 5.** Identification of a self-derived HLA-B27 ligand differentially detected in PqqC transfectant cells. (A) MALDI-TOF MS spectra of fr. 182 from the HLA-B27-bound peptide pools isolated from the PqqC transfectant (above) and untransfected B\*2705-C1R cells (below), showing an ion peak, at  $m/z$  1183.5, differentially present in the bacterial transfectant. Only the relevant sections of the spectra are shown. This ion peak was also not detected in the adjacent fractions, N. 181 and N. 183, of the untransfected cells (not shown). The ion peak at  $m/z$  1171.1 and 1205.6 of the bacterial transfectant, labeled with an asterisk, were shared ligands found in an independent preparation and in the adjacent fraction N. 183 from B\*2705-C1R, respectively (not shown). (B) MALDI-TOF/TOF MS/MS spectra of the ion peak at  $m/z$  1183.5 from the bacterial PqqC transfectant, showing the assigned sequence (above) and that of the corresponding synthetic peptide (below).

**Table 1.-Homology of naturally processed HLA-B27 ligands from *C. trachomatis* with human protein sequences**

Sequence <sup>a</sup>	% identity	Organism	Parental protein (residues)	Accession N
<b>KRALLEIVT</b>	---	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Na <sup>+</sup> -translocating NADH-quinone reductase subunit A, NQRA(86-94)	<b>O84639</b>
<b><u>ARALLEIIM</u></b>	66.7	<i>Homo sapiens</i>	DnaJ homolog protein, DNAJB14(43-51)	<b>Q8TBM8</b>
<b>ARKLLLDNL</b>	---	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Pyrroloquinoline-quinone synthase protein, PqqC(70-78)	<b>O84616</b>
<b><u>LRKLLLDQV</u></b>	66.7	<i>Homo sapiens</i>	Exportin-6 protein, Exp6(172-180)	<b>Q96QU8</b>

<sup>a</sup>Residues in the human sequences identical to the bacterial peptides are underlined



**Figure 1**

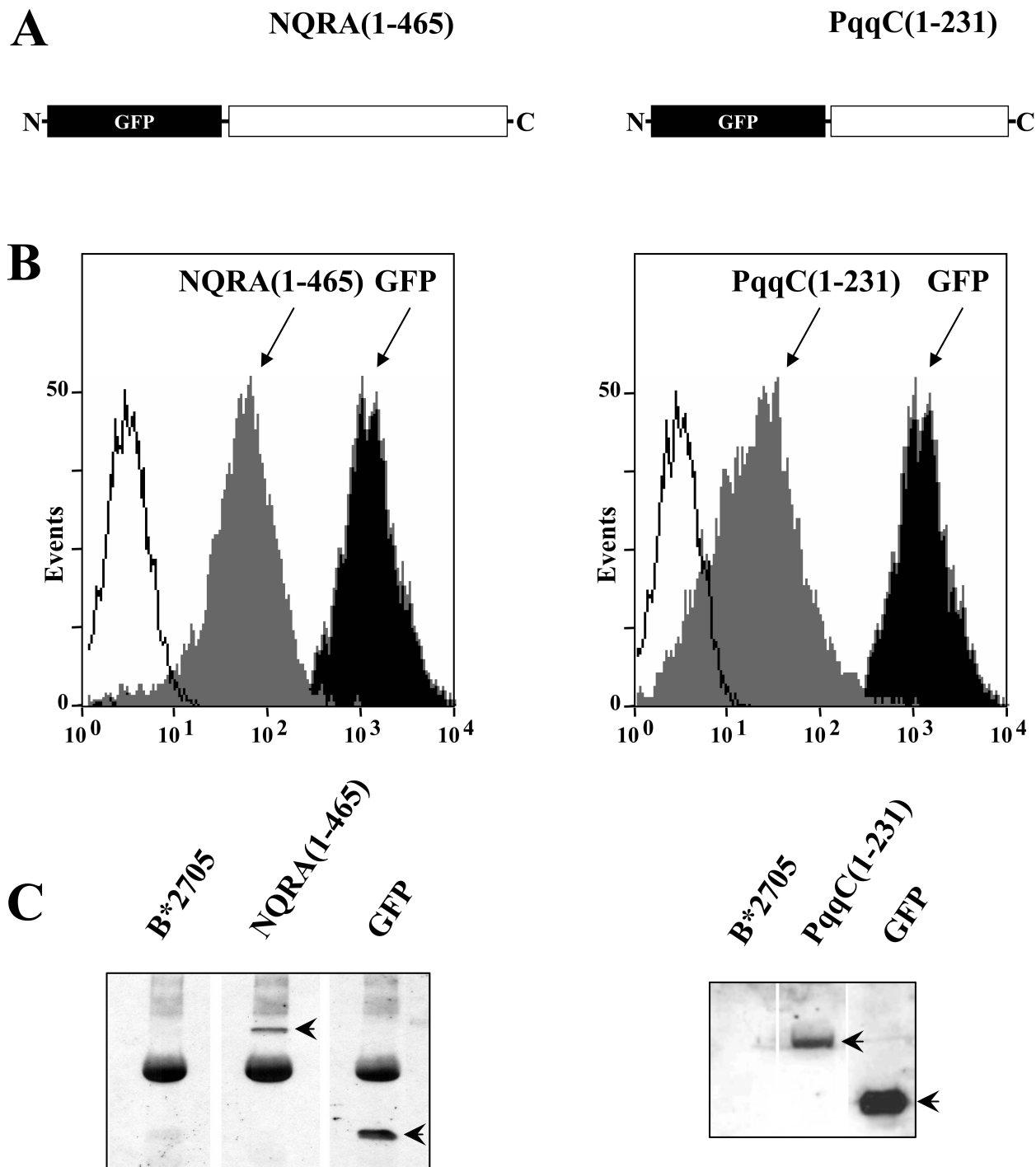
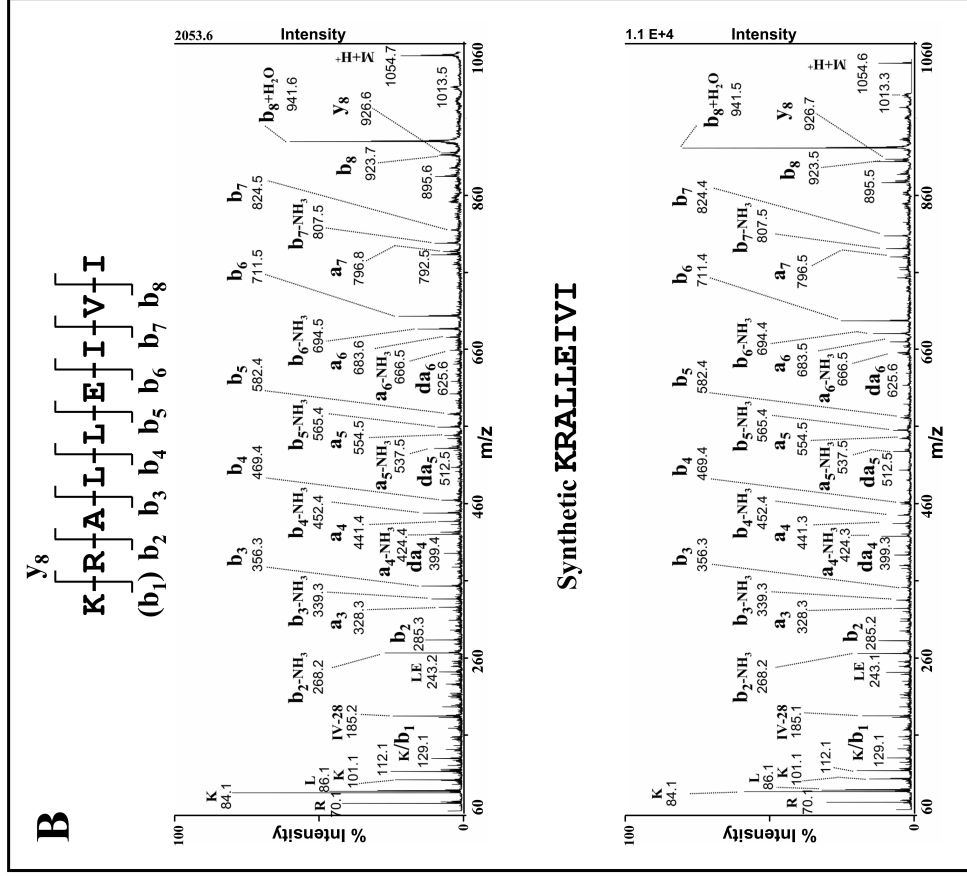
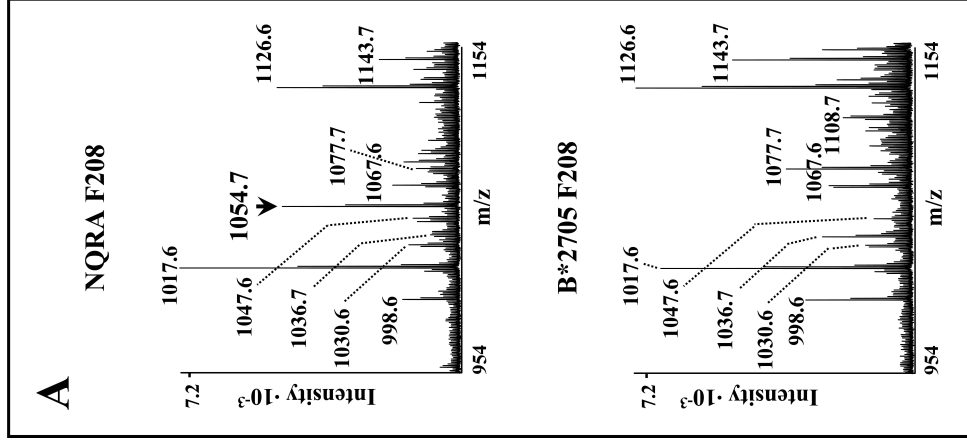


Figure 2



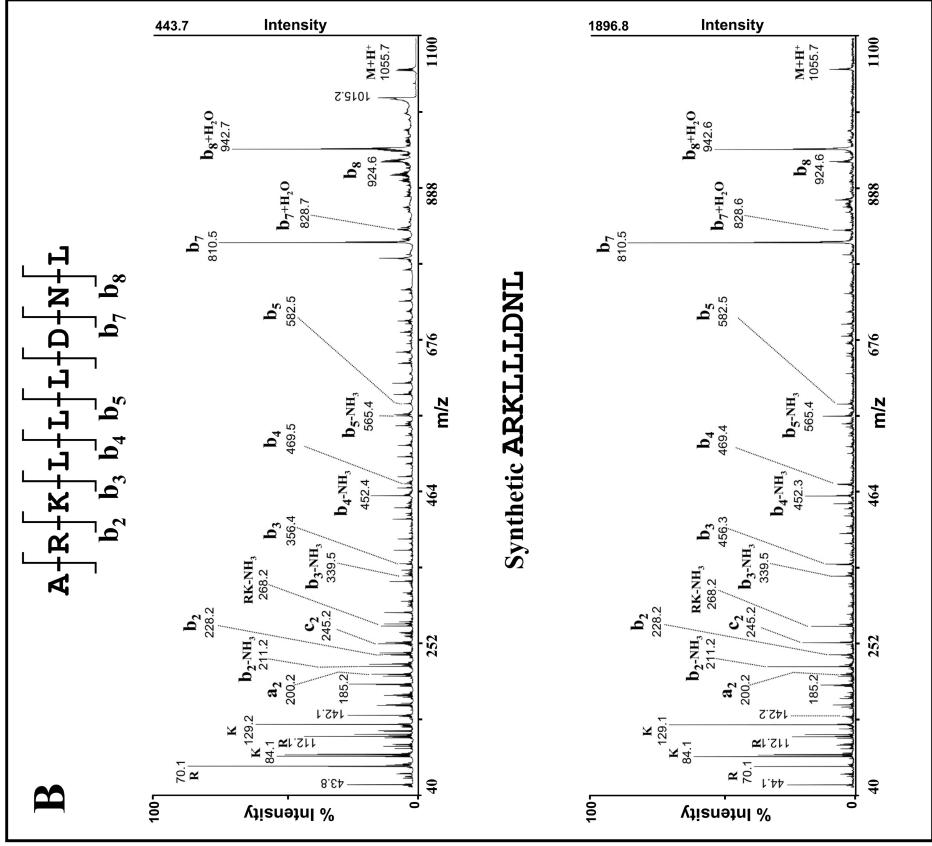
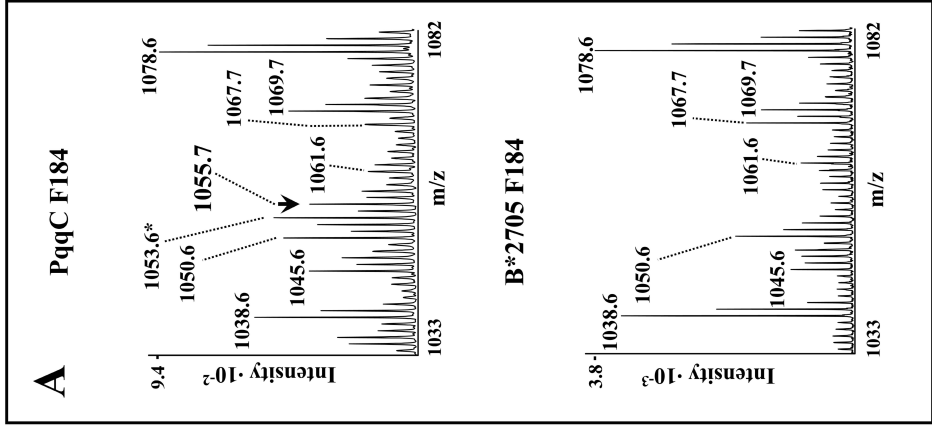
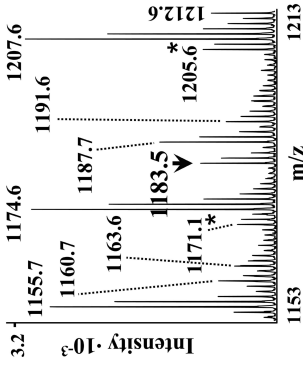


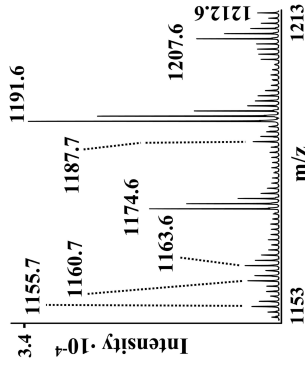
Figure 4

A

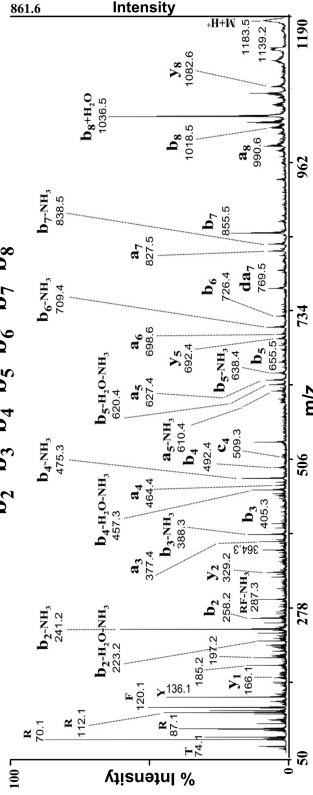
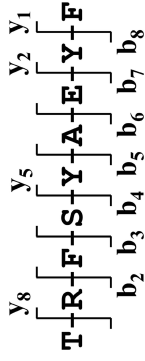
PqqC F182



B\*2705 F182



B



Synthetic TRFSYAEYF

